# Die Regulation der Kontraktion im Invertebratenmuskel: Studien am Spritzwurm *Sipunculus nudus* L.

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
**Maria A. Morris**
aus Münster

Düsseldorf 1987

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0061

# DIE REGULATION DER KONTRAKTION IM INVERTEBRATENMUSKEL:

# STUDIEN AM SPRITZWURM SIPUNCULUS NUDUS L.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Maria A. Morris
aus Münster

Düsseldorf 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. K. Grieshaber

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. D´Haese

Meinen Eltern
Für Steve

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | Einleitung | 1 |
| II. | Material und Methoden | 9 |
| 1. | Versuchstiere<br>Sipunculus nudus<br>Sprague Dawley Ratten | 9 |
| 1.1 | Gehäutete und glycerinextrahierte Fasern | 9 |
| 1.1.1 | Präparation<br>Sipunculus nudus<br>Sprague Dawley Ratten | 9 |
| 1.1.2 | Häutungsverfahren | 10 |
| 1.1.3 | Faserpräparation | 11 |
| 2. | Experimente an gehäuteten Fasern - Isometrische Kontraktion | 12 |
| 2.1 | Die isometrische Meßanordnung | 12 |
| 2.2 | Inkubation | 13 |
| 2.2.1 | Aufbau | 13 |
| 2.2.2 | Inkubationsmedien | 14 |
| 2.2.3 | Variation der freien $Ca^{2+}$-Konzentration | 15 |
| 2.2.4 | EDTA-Behandlung der gehäuteten Fasern | 16 |
| 2.2.5 | Spezielle Inkubationszusätze | 16 |
| 2.3 | Auswertung der Kontraktionsexperimente | 17 |
| 2.3.1 | Bestimmung der $Ca^{2+}$-Sensitivität der Fasern | 17 |
| 2.3.2 | Hill-Diagramm | 17 |
| 3. | Präparation von Myofibrillen | 18 |
| 4. | Präparation von Aktomyosin | 18 |
| 5. | Präparation von Myosin | 19 |
| 6. | EDTA-Behandlung der Myofibrillen, des Aktomyosins und des Myosins | 20 |
| 6.1 | Myofibrillen | 20 |
| 6.2 | Aktomyosin und Myosin | 20 |
| 7. | DTNB-Behandlung des Myosins - Isolierung der leichten Ketten des Myosins | 21 |
| 8. | Affinitätssäulenchromatographie - Reinigung der leichten Ketten | 22 |
| 9. | Präparation von Myosin, HMM und Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskulatur | 22 |
| 10. | Bestimmung der Proteinkonzentration | 23 |
| 11. | Bestimmung der ATPase-Aktivität | 23 |
| 12. | Gleichgewichtsdialyse - Bindung von $Ca^{2+}$ an Myosin | 23 |
| 13. | Gelelektrophoretische Techniken | 25 |

13.1 SDS-Polyacrylamid-Gradienten-Gelelektrophorese (SDS-PAGGE) 25
13.2 Pyrophosphatextraktion des Myosins und elektrophoretische Isolierung des Myosins in der Pyrophosphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 25

III. Ergebnisse 27

1. Beschreibung der isometrischen Kontraktion 27
1.1 $Ca^{2+}$-Sensitivität der Faserbündel 27
1.2 Der $Q_{10}$ der Kraftentwicklung 27

2. Die Abhängigkeit der isometrischen Kraftentwicklung der gehäuteten Fasern von der freien $Ca^{2+}$-Konzentration 28

3. Koffeininduzierte Kontraktionen 33

4. Einfluß von cAMP auf die Kraftentwicklung 38

5. Versuche zum indirekten Nachweis der Existenz einer $Ca^{2+}$-calmodulinabhängigen Myosinkinase 40
5.1 Effekte von Calmodulin und calmodulinspezifischen Inhibitoren 40
5.1.1 Die Wirkung von Calmodulin 40
5.1.2 Der Einfluß von Phenothiazinderivaten auf die $Ca^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung 43
5.2. Einfluß verschiedener Substratanaloge (ITP; ATP S) auf die Kraftentwicklung, auf die ATPase-Aktivität und auf die $Ca^{2+}$-Sensitivität 47
5.2.1 Die Einflüsse von ITP 47
5.2.2 Effekte von ATP S 54

6. Charakterisierung des Myosins - Versuche zur myosingekoppelten Regulation und zum direkten Nachweis der $Ca^{2+}$-Bindung an das Myosin als potentiellem Regulationsmechanismus 57
6.1 SDS-PAGGE des Myosins 57
6.2 Abhängigkeit der $Ca^{2+}$-Myosin-ATPase-Aktivität von der freien $Ca^{2+}$-Konzentration 59
6.3 Zusammenhang zwischen freier $Ca^{2+}$-Konzentration und aktinaktivierter $Mg^{2+}$-abhängiger Myosin-ATPase-Aktivität 60
6.4 Bindung von $Ca^{2+}$ an Myosin 61

7. Pyrophosphatgelelektrophorese 63

8. Desensibilisierungs- und Resensibilisierungsexperimente 65
8.1 Desensibilisierungsexperimente 65
8.1.1 Desensibilisierung des Myosins 65
8.1.2 Desensibilisierung des Aktomyosins 66
8.1.3 Desensibilisierung der gehäuteten Fasern 69
8.2 Versuche zur Resensibilisierung der gehäuteten Fasern 70
8.2.1 Hohe $Mg^{2+}$-Konzentration 70
8.2.2 EDTA-Extrakt aus Myofibrillen 71

8.2.3 DTNB-extrahierte leichte Kette 73
8.3 Resensibilisierung des Aktomyosins 81

IV. Diskussion 82

1. Koffeininduzierte Kraftentwicklung 82
2. Myosinkinase/-phosphatase System 85
3. Die Rolle der Calcium-Ionen 89
4. Myosin und die $Ca^{2+}$-Bindung an das Myosin 90
5. Desensibilisierung und Resensibilisierung 94
6. Die Rolle des Nukleotids 100

V. Zusammenfassung 105

VI. Abkürzungen 108

VII. Literaturverzeichnis 109

# I. EINLEITUNG

Vielzellige tierische Organismen besitzen spezialisierte, der Bewegung dienende Organe - die Muskeln. Aufgrund ihrer Funktion, der Struktur und des molekularen Mechanismus der Kontraktionsregulation lassen sich verschiedene Muskeltypen unterscheiden. Die Unterschiede in der Struktur haben zu einer Einteilung der Muskeln in quergestreifte, glatte und schräggestreifte Muskeln geführt.

Im feinstrukturellen Bau der kontraktilen Struktureinheiten, der Sarkomeren, bestehen aber keine grundsätzlichen Unterschiede und viele Hinweise (Lowy et al., 1966; Rosenbluth, 1967; Heumann & Zebe, 1968; Heumann, 1969) bestätigen die Allgemeingültigkeit der Gleitfilamenttheorie der Muskelkontraktion für die verschiedenen Muskeltypen, wie sie von Huxley & Niedergerke (1954) und von Huxley & Hanson (1954) für den Skelettmuskel der Vertebraten postuliert wurde. Für alle muskulären Bewegungsvorgänge wurde auch gefunden, daß chemische Energie in den sogenannten Querbrückenzyklen in mechanische Energie umgewandelt wird, und daß der Träger der chemischen Energie das Adenosintriphosphat (ATP) ist.

Auch die Auslösung der Kontraktion durch $Ca^{2+}$ als Mittler zwischen Nervenimpuls und Kontraktion scheint universell zu sein. Grundlage für seine Signalwirkung ist die Regulierbarkeit der intrazellulären $Ca^{2+}$-Konzentration und die funktionelle Modulation der $Ca^{2+}$-Rezeptorproteine.

Es ist allgemein anerkannt, daß die Hydrolyse des $Mg^{2+}$-ATP durch ein Aktomyosinsystem Grundlage des mechanochemischen Geschehens während der Muskelkontraktion ist. Beim Anstieg der sarkoplasmatischen $Ca^{2+}$-Konzentration (von ca. $10^{-7}$ $mol \cdot l^{-1}$ auf ca. $10^{-5}$ $mol \cdot l^{-1}$) kommt es im Aktomyosin-System zu einer Wechselwirkung zwischen den Proteinen der dünnen und dicken Filamente, d.h. zwischen Aktin und Myosin. Die Interaktion erfolgt über die sogenannten Querbrücken, gebildet von Myosinköpfen, die seitlich aus den dicken Filamenten herausragen. Diese enzymatisch aktiven globulären Anteile der

Myosinmoleküle tragen die Aktinbindungsstelle(n). Sie werden durch die Hydrolyse des $Mg^{2+}$-ATP in einen interaktionsbereiten "aktivierten" Zustand versetzt. In dem sich konstituierenden Aktomyosinkomplex wird die Spaltungsrate von $Mg^{2+}$-ATP durch Aktin gesteigert. Die Querbrücken machen zwischen Komplexbildung und -lösung reversible Konformationsänderungen durch. Die Komplexformation läuft repetetiv in den sogenannten Querbrückenzyklen ab. Sie sind im intakten kontraktilen Apparat, wenn die Querbrücken entlang der dünnen Filamente angreifen, für das Gleiten der dünnen Filamente zur Sarkomermitte und letztlich für Verkürzung und Kraftentfaltung des Muskels verantwortlich.

Bei niedrigen $Ca^{2+}$-Konzentrationen (ca. $10^{-7}$ mol·$l^{-1}$) scheint der Querbrückenzyklus unterbunden zu sein. Wie sich in vielen Untersuchungen gezeigt hat, wirken $Ca^{2+}$-Ionen auf die Aktomyosin-ATPase verschiedener Herkunft über unterschiedliche Mechanismen - mittelbar über $Ca^{2+}$-Rezeptorproteine - regulatorisch.

Am besten untersucht und in der $Ca^{2+}$-Regulation der Muskelkontraktion maßgebend ist das Troponin-Tropomyosin-System (TN-TM-System) des Vertebraten Skelettmuskels (Ebashi & Endo, 1968; Weber & Murray, 1973) mit Troponin-C als $Ca^{2+}$-bindendem Protein. Das TN-TM-System ist mit dem Aktin in den dünnen Filamenten assoziiert. Man spricht deshalb von einer aktingekoppelten Regulation (Lehman & Szent-Györgyi, 1975). Die $Ca^{2+}$-Bindung an das TnC bewirkt eine Konformationsänderung des Troponinmoleküls und eine Verlagerung des TN-TM-Komplexes derart, daß Myosinbindungsstellen am Aktin freigelegt werden. Bei Reduktion der $Ca^{2+}$-Konzentration in der Skelettmuskelzelle wirkt der TN-TM-Komplex auf die Aktin-Myosin-Interaktion inhibitorisch.

Im glatten Vertebratenmuskel liegt eine maßgeblich myosingekoppelte Regulation vor. Die Erhöhung des $Ca^{2+}$-Spiegels bewirkt die Bildung eines aktiven $Ca^{2+}$-Calmodulin-Komplexes, der die Aktivität einer Myosinkinase steigert und zur Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins ( $M_r$: 20.000)

führt (Dabrowska et al., 1978; Adelstein & Klee, 1981). Die Phosphorylierung vermindert vermutlich die inhibitorische Wirkung der leichten Ketten und führt zu einer $Ca^{2+}$-abhängigen Zunahme der Aktomyosin-ATPase-Aktivität (Chacko et al., 1977; Lebowitz & Cooke, 1979; Chacko & Rosenfeld, 1982) sowie der isometrischen Kraftentwicklung (Cassidy et al., 1981; Walsh et al., 1982; Stull et al., 1980). ATPase-Aktivität und Phosphorylierung sind positiv korreliert (Sobieszek, 1977). Nimmt die intrazelluläre $Ca^{2+}$-Konzentration ab, zerfällt der $Ca^{2+}$-Calmodulin-Myosinkinase-Komplex und die leichten Ketten werden durch eine $Ca^{2+}$-unabhängige Phosphatase dephosphoryliert (Small & Sobieszek, 1977; Chacko et al., 1977).

Auch bei einigen Invertebraten wurde eine indirekte Aktivierung des Myosins über eine $Ca^{2+}$-abhängige Phosphorylierung der leichten Ketten gefunden (Sellers; 1981; Kerrick & Bolles, 1982).
Bei vielen Invertebraten jedoch wird die Aktin-Myosin-Wechselwirkung durch die Bindung der $Ca^{2+}$-Ionen direkt an das Myosin gesteuert (Kendrick-Jones et al.,1970; Lehman et al., 1973; Lehman & Szent-Györgyi, 1975; D´Haese, 1980). Erste Hinweise auf einen derartigen Mechanismus erhielten Kendrick-Jones et al. (1970) und Szent-Györgyi et al. (1973) bei ihren Arbeiten am Molluskenmuskel. Sie zeigten, daß das Molluskenmyosin $Ca^{2+}$ bindet und seine Interaktion mit unreguliertem Aktin (ohne TN-TM-Komplex) aus dem Skelettmuskel von der $Ca^{2+}$-Konzentration abhängig ist. Die Regulation durch $Ca^{2+}$ erwies sich als mit spezifischen leichten Ketten des Molluskenmyosins verbunden. Das wurde verdeutlicht, indem diese leichten Ketten durch EDTA (EDTA-leichte-Kette) vom Myosin selektiv entfernt werden konnten, wodurch es zu einem Verlust der Regulation kam, d.h., das EDTA-behandelte Myosin brauchte für die Interaktion mit Aktin kein $Ca^{2+}$ mehr (Chantler & Szent-Györgyi, 1980). Auch war die $Ca^{2+}$-Bindung des derart desensibilisierten Myosins reduziert (Szent- Györgyi et al., 1973). Die Rekombination von desensibilisiertem Myosin mit der EDTA-leichten-Kette stellte die $Ca^{2+}$-Bindung und die Regulation wieder her.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Für die Anordnung der regulatorischen Proteine im Myosinkopf (s. Abb. 1) und über den Mechanismus wie Repression und Derepression der Aktin-Myosin-Interaktion durch die regulatorischen Proteine kontrolliert werden gibt es für den Molluskenmuskel folgende weiterreichende Vorstellungen (Vibert et al., 1986).

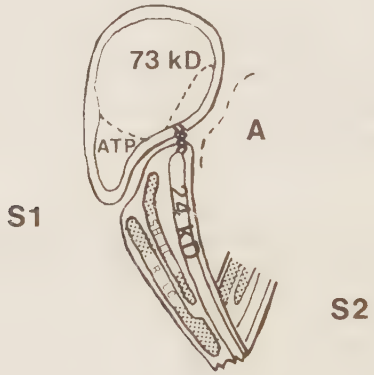


Abb. 1: Topographie des Myosinkopfes des Kammuschelmyosins
Eine flexible, proteolyseempfindliche Region verbindet zwei Hauptdomänen ($M_r$: 73.000 und 24.000). Die zwei leichten Ketten (SH-LC, R-LC), lokalisiert in der regulatorischen Domäne, wurden als zwei sich überlappende Stäbe dargestellt.
A, Aktin; R-LC, regulatorische leichte Kette; SH-LC, essentielle leichte Kette; S1, Untereinheit des Myosinkopfes, proteolytisches Spaltprodukt bei der Papainbehandlung; S2, Hals des Myosinmoleküls, reicht bis zur proteolyseempfindlichen Stelle gegenüber Trypsin (nach Vibert et al.,1986)

Die EDTA-leichte Kette oder regulatorische leichte Kette bildet zusammen mit der essentiellen leichten Kette und einem Teil der schweren Kette eine regulatorische Domäne (Winkelmann et al., 1984), die die langgestreckte Halsregion des Myosinmoleküls einnimmt. Pro Myosinmolekül gibt es zwei regulatorische Domänen. Die Nukleotidbindungsstellen sollen distal in einer zweiten Domäne des Kopfes lokalisiert sein. Strukturanalysen zufolge sind auch die Aktinbindungsstellen

distal am Kopf lokalisiert (Vibert et al, 1982; Winkelmann et al., 1983). Nach der Topographie des Myosinkopfes von Vibert et al. (1986) befinden sie sich in der Verbindungsregion zwischen den Hauptdomänen des Myosinkopfes (s. Abb. 1). Ein direkter Kontakt zwischen Aktin- und Nukleotidbindungsstellen und den langgestreckten leichten Ketten (Stafford & Szent-Györgyi, 1978) besteht vermutlich nicht (Vibert & Craig, 1982).

Bei einer Aktivierung soll es zu einer relativen Bewegung der regulatorischen leichten Kette und essentiellen leichten Kette zueinander (Hardwicke et al., 1983) kommen. Die $Ca^{2+}$-Bindung am Molluskenmyosin bewirkt vermutlich eine Verlagerung der Peptide in der regulatorischen Domäne nahe der Kopf-Schwanz-Region (S1-S2-Region). Diese innermolekulare Bewegung soll sich auf die distale Domäne des Kopfes erstrecken und dadurch die Hemmung der Querbrückenanheftung aufheben. Weiter soll diese Bewegung zu einer Interaktion der regulatorischen leichten Ketten in der S1-S2-Region führen und erklären, weshalb die S2-Region des Myosinmoleküls für die Regulation möglicherweise essentiell ist (Stafford et al., 1979). Die $Ca^{2+}$-induzierte Verlagerung der Peptide führt darüber hinaus zu einer Veränderung der Myosin-ATPase-Aktivität (Wells & Bagshaw, 1985), woraus auch auf eine Beeinflussung der Nukleotidbindungsstelle durch die Bewegung der Domänen geschlossen wurde (Vibert et al., 1986). Die leichten Ketten sollen, entgegen der Vorstellung, daß die leichten Ketten selbst die Interaktion sterisch blockieren, nach Vibert et al. (1986) Inhibitoren der Domänenbewegungen sein.

Bei den Invertebraten ist die duale Regulation, das heißt, das Vorkommen von aktin- sowie myosingekoppelter Regulation in demselben Muskel weit verbreitet (Lehman & Szent-Györgyi, 1975). An der aktingekoppelten Regulation sind TN-TM-Systeme beteiligt. Die Arbeiten der letzten Jahre deuten darauf hin, daß die unterschiedlichen muskulären kontraktilen Systeme alle einer dualen $Ca^{2+}$-Kontrolle unterliegen.

Für den Molluskenmuskel, der wie dargestellt als myosinkontrolliert gilt, konnte nach anfänglich fehlendem Nachweis einer Aktinkontrolle gezeigt werden, daß sich aus den Muskeln troponinähnliche Proteine gewinnen lassen, und daß sie in hohen Konzentrationen in einem synthetischen dünnen Filament wirksam werden können. Die Troponin-Konzentration ist aber in vivo wahrscheinlich zu gering, um an den dünnen Filamenten größeren regulatorischen Einfluß nehmen zu können (Lehman et al., 1972; Goldberg & Lehman, 1978).

Mit den dünnen Filamenten verbundene, gemeinsam mit der Phosphorylierung der leichten Ketten auf die Aktomyosin-ATPase aktivierend wirkende $Ca^{2+}$-Regulationssysteme wurden auch für den glatten Vertebratenmuskel vorgeschlagen. Einerseits wurde von Marston et al. (1980) und von Walters & Marston (1981) demonstriert, daß in den dünnen Filamenten des glatten Muskels troponinähnliche Proteine regulatorisch wirksam werden. Andererseits soll Caldesmon (Sobue et al., 1981), ein Protein, das je nach $Ca^{2+}$-Konzentration an Calmodulin oder an Aktin bindet (Flip-Flop-Mechanismus; Sobue et al., 1982), nach neueren Erkenntnissen (Ngai & Walsh, 1984 und 1985; Fürst et al., 1986; Marston, 1986) an der $Ca^{2+}$-abhängigen Regulation der Aktomyosin-ATPase-Aktivität der glatten Muskeln der Vertebraten beteiligt sein.

Die Arbeitsgruppe von Ebashi vertritt demgegenüber die Ansicht, daß die Kontraktion der glatten Muskeln allein durch ein troponinähnliches $Ca^{2+}$-sensitives Protein, das sie Leiotonin nannten, reguliert ist (Ebashi et al., 1977; Mikawa et al., 1977; Mikawa et al., 1978).

Die ATPase-Aktivität des Aktomyosins der schräggestreiften Muskulatur aus dem HMS und aus dem Retraktor des marinen Spritzwurms Sipunculus nudus L. ist dual reguliert (Schäper, 1982). Für die Aktinkontrolle der Interaktion von Aktin und Myosin ist bei Sipunculus nudus wahrscheinlich ein TN-TM-Komplex verantwortlich, denn die Komponenten, die ihn konstituieren könnten, wurden in relativ hoher Konzentration in den isolierten dünnen Filamenten gefunden. Für das Aktinmono-

mer wurde in der SDS-PAGGE eine relative Molekülmasse von ca. 45.000 bestimmt. Die Regulatorproteine Tropomyosin und Troponin wurden in zwei ($M_r$: 40.000 und 38.000) bzw. drei Untereinheiten ($M_r$: 50.000, 33.000 und 21.000) getrennt.

Die Präparationen der dünnen Filamente verliehen dem Hybrid mit dem schweren Meromyosin (HMM) aus der Kaninchen-Skelettmuskulatur $Ca^{2+}$-Sensitivität in der ATPase-Aktivität, womit die Kontrolle der Interaktion auf den dünnen Filamenten lokalisiert werden konnte.

Das Myosin besteht aus schweren Ketten mit einer relativen Molekülmasse von ca. 208.000 und leichten Ketten, für die ein Molekulargewicht von ca. 18.700 und 17.700 ermittelt wurde. Auch das Hybrid des isolierten Myosins mit unregulierten Aktin war $Ca^{2+}$-sensitiv in der ATPase-Aktivität. Das sprach für die Lokalisierung der $Ca^{2+}$-Kontrolle am Myosin.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war eine nähere Untersuchung und Klärung des Mechanismus der myosingekoppelten Regulation und seine Bedeutung für die quantitative Beziehung zwischen freier $Ca^{2+}$-Konzentration und ATPase-Aktivität des Myosins bzw. der Kraftentwicklung der schräggestreiften Muskulatur.

Die Untersuchungen gliederten sich in folgende Komplexe:

1. An chemisch gehäuteten und glycerinextrahierten Faserbündeln aus der Längsmuskulatur und dem Retraktor von Sipunculus nudus soll die Empfindlichkeit der Kraftentwicklung gegenüber der freien $Ca^{2+}$-Konzentration ermittelt werden.

2. Um eine mögliche Wirkung von Calmodulin als Regulatorprotein bzw. den Einfluß einer $Ca^{2+}$-CaM-abhängigen Myosinkinase auf die Regulation der Kraftentwicklung zu untersuchen, sollen verschiedene, den Regulationstyp der glatten Vertebratenmuskulatur klassifizierende Nachweismethoden angewendet werden. Vergleichende Experimente sollen am Myometrium des Rattenuterus durchgeführt werden.

3. Für den Nachweis einer Regulation über direkte $Ca^{2+}$-Bindung an das Myosin sollen unter anderem die $Ca^{2+}$-Abhängigkeit der aktinaktivierten ATPase-Aktivität sowie eine hochaffine spezifische $Ca^{2+}$-Bindung an isoliertem Myosin untersucht werden.

4. Die Möglichkeit der reversiblen Dissoziation der regulatorischen Proteine vom Myosin soll geprüft, und die Bedeutung der Desensibilisierung und Resensibilisierung für die Aktomyosin ATPase-Aktivität und die Kraftentwicklung der Faserbündel soll gezeigt werden.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Versuchstiere

Sipunculus nudus
Die Versuchstiere stammten von der bretonischen Küste, aus Morgat und Loquémeau (Frankreich). Die Tiere wurden lebend in Behältern mit eisgekühltem Wasser nach Düsseldorf transportiert und dort im biotopeigenen Sediment mit überstehendem belüftetem Wasser bei 15° C im Meerwasseraquarium des Instituts gehältert.

Sprague Dawley Ratten
Die weiblichen Versuchstiere waren Zuchttiere aus der Tierabteilung des Diabetes Forschungsinstituts Düsseldorf.

### 1.1 Gehäutete und glycerinextrahierte Fasern

#### 1.1.1 Präparation

Sipunculus nudus
Der Körper der Tiere wurde mit einer Schere durch einen Längsschnitt geöffnet. Die heraustretende Coelomflüssigkeit wurde verworfen. Der Hautmuskelschlauch (HMS) wurde ausgebreitet und in einer Präparierschale mit Nadeln festgesteckt. Das Bauchmark und die inneren Organe wurden mit der Pinzette entfernt. Die Reste der Coelomflüssigkeit wurden mit künstlichem Seewasser gründlich abgespült. Die Retraktoren wurden vom HMS und Introvert getrennt und separat behandelt.

Sprague Dawley Ratten
Die ca. 230 g schweren Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion mit 30-40 $mg \cdot kg^{-1}$ Körpergewicht Natriumpentobarbital (Nembutal$^{R}$) anästhesiert. Die Uteri duplex wurden nach Exzision vom Fettgewebe befreit und mit physiologischer Salzlösung (118 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl; 5,7 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 1,2 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$, 2,5 $mmol \cdot l^{-1}$ $CaCl_2$, 12,5 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaHCO_3$;

11,1 mmol·l$^{-1}$ Glucose; 0,01 mmol· l$^{-1}$ EDTA; pH 7,2 ; Janis et al., 1981) mehrfach abgespült und darin kurzzeitig, bis zur Häutung, eisgekühlt aufbewahrt.

### 1.1.2 Häutungsverfahren

Der HMS (s. Abb. 2), die Retraktoren und die Rattenuteri wurden als Gesamtorgan nach Rüegg et al. (1981) chemisch gehäutet und glycerinextrahiert. Das erschien auch für den HMS angebracht, denn das Ablösen der einzelnen Längsfaserbündel und das Fixieren mit Seidenfäden an Holzstäben für die Häutungsprozedur ist, was die Zugänglichkeit der Häutungslösungen anbetraf, nur als geringe Änderung zur in situ Situation anzusehen. Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, treten die Längsmuskelbänder im Querschnitt lappenförmig hervor. Schätzungsweise dreiviertel der Bündeloberfläche hatten so direkten Kontakt zum umgebenden Behandlungsmilieu.

Die befestigten Muskelgewebe wurden zunächst für 2 h bei 4° C in einer Ca-freien Lösung (50 mmol·l$^{-1}$ KCl; 20 mmol·l$^{-1}$ Imidazol-HCl pH 7,4; 5 mmol·l$^{-1}$ EGTA; 150 mmol·l$^{-1}$ Saccharose) zur Entfernung des $Ca^{2+}$ gespült. Nach 1 h wurde die Lösung gewechselt. Die Häutungslösung, in die die Präparate nach 2 h gebracht wurden, war substantiell gleich zusammengesetzt, hinzugefügt wurden Triton$^{R}$ X-100 (1%), ein nichtionisches Detergens, und Dithiothreit (DTT; 0,5 mmol·l$^{-1}$). Die Inkubationsdauer in der Häutungslösung betrug generell 30 min. In einzelnen Fällen wurden die Gewebe bis zu mehreren Stunden darin belassen. Die Präparate wurden danach in einem 1:1 Gemisch aus Glycerin (99,5%) und Puffer folgender Zusammensetzung: (20 mmol·l$^{-1}$ Imidazol; 4 mmol·l$^{-1}$ EGTA; 10 mmol·l$^{-1}$ $MgCl_2$; 7,5 mmol·l$^{-1}$ ATP; 10 mmol·l$^{-1}$ $NaN_3$; pH 6,7) extrahiert und darin bis zum Versuch bei 4° C aufbewahrt. Das Gemisch enthielt 0,5 mmol·l$^{-1}$ DTT. Die Faserpräparate wurden mindestens für 30 min in dem Gemisch gespült (Ausnahme: Koffeinexperimente).

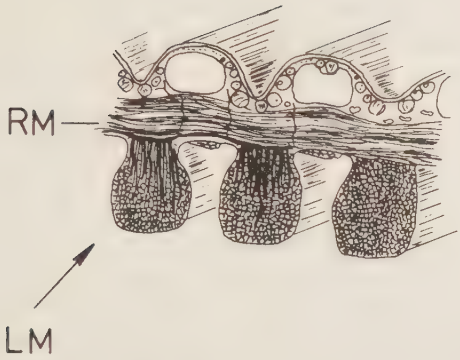


Abb. 2: Querschnitt in der Rumpfregion durch den Hautmuskelschlauch von Sipunculus nudus
LM: Längsmuskelbänder (quergetroffen), RM: Ringmuskulatur (längsgetroffen)
Verändert aus Baltzer (1931), nach Metalnikoff (1900)

Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden die Längsmuskelbänder von dem HMS abgelöst und wie die Retraktoren in dünnere Fibrillenbündel geteilt und bei -20° C in dem Glycerin-Puffergemisch gelagert. Die Fasern waren nach mehrmonatiger Aufbewahrungszeit noch mit $Mg^{2+}$-ATP und $Ca^{2+}$ kontraktionsfähig. Allerdings war die Kraftentwicklung geringer.

### 1.1.3 Faserpräparation

Für die meisten Kontraktionsexperimente wurden Faserbündel aus den Längsmuskelbändern verwendet. Nach der Häutung ließen sich vollständige Längsfaserbündel leicht aus dem HMS lösen. Die Längsmuskelbänder wurden längs geteilt, so daß der Durchmesser der Präparate etwa 200-500 um betrug. Es wurden dann solche Faserbündel ausgewählt, die in ihrem Querschnitt annähernd rund und über ihre gesamte Länge (ca. 5 mm) gleich dick waren. Nur in einer Versuchsreihe (s. III. 2) wurden 10 mm lange, über den gesamten Querschnitt der Längsfaserbündel gehende Bündelstücke eingesetzt.

Von dem gehäuteten Rattenuterus wurden Streifen des Myometriums mit einer Pinzette abgezogen und sofort in die Versuchsapparatur eingebracht.

## 2. Experimente an gehäuteten Fasern - Isometrische Kontraktion

### 2.1 Die isometrische Meßanordnung

Die Meßeinheit bestand aus einem Zug- und Druckkraftgeber (Statham - Universalzelle UC2) einer Gleichspannungsmeßbrücke (Hugo Sachs Elektronik) und einem Schreiber (Kipp und Zonen, BD 9).

Die Kraft griff in Richtung der Längsachse des Gebers an einem herausstehenden Stift an. Geber und Präparat wurden vertikal orientiert. Die Übertragung der isometrischen Kraft vom Präparat zum Geber erfolgte auf verschiedene Art und Weise: entweder über einen dehnungsresistenten Faden, der über eine Schlaufe mit dem wandlereigenen aufsetzbaren Gewindestück mit Haken verbunden war und am anderen Ende eine Glasperle trug, oder mit einem dem Transducerstift angepaßten Metallstab mit Haken. Das Gewicht des Metallstabs betrug 2,13 g. Der Schaft des Stabes wurde so konstruiert (Zentralwerkstatt der Biologie; Universität Düsseldorf), daß er bei Überbelastung vom Stift des Transducers abrutschte.

Das Faserpräparat wurde mit Gewebekleber (Histoacryl$^{R}$ blau, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) zwischen der Glasperle bzw. dem Metallhaken und einem gebogenen Metallstab befestigt und so in das Inkubationsgefäß eingetaucht (s. 2.2.1). Das Inkubationsgefäß wurde dazu mit einer Hebelanordnung plaziert (s. 2.2.1; s. Abb. 3). Das Faserbündel wurde dann über eine Mikrometeranordnung, in der der Wandler frei aufgehängt war, so vorgedehnt, daß das Faserbündel im Erschlaffungspuffer gerade Kraft entwickelte. Die Faserbündel wurden für einige Zeit in dem Erschlaffungspuffer belassen, um das Glycerin auszuwaschen.

Die Meßanordnung wurde mit einem Metallstück bekannten Gewichts geeicht. Der Signalausgang am Schreiber für diese Kraft wurde registriert. Die Schreibfederauslenkung wurde von der Nullinie aus gemessen. Die angreifende Kraft des Faserbündels konnte so durch die Größe der Schreiberfederauslenkung ermittelt werden.

## 2.2 Inkubation

### 2.2.1 Aufbau

Die Inkubation erfolgte in einer temperierten 4 ml Plastikküvette. Bei den Experimenten mit Faserbündeln von Sipunculus nudus betrug die Inkubationstemperatur 15° C. Für die Faserpräparate vom Rattenuterus wurden die Inkubationsmedien auf 37° C temperiert. Das Inkubationsvolumen betrug 2 bzw. 3 ml. Für einen Badwechsel wurde die Küvette mit einer Hebelanordnung abgesenkt, die Küvette durch eine andere entsprechend vortemperierte ersetzt und diese wieder angehoben, so daß das Präparat möglichst ohne starke Beeinträchtigung innerhalb weniger Sekunden erneut eingetaucht wurde.

Diese Anordnung wurde durch eine temperier-, absenk- und drehbare Trommel ersetzt (Zentralwerkstatt der Biologie; Universität Düsseldorf; s. Abb. 3).

Sie enthält Ausbohrungen für die Inkubationsgefäße. Das Wechseln der Gefäße wurde dadurch erleichtert und beschleunigt. Die Trommel wird mit einer Hebelvorrichtung abgesenkt. Sie wird dann von Hand bis zur nächsten Arretierung gedreht, die über ein Kugellager so justiert ist, daß die Küvette exakt die Position der anderen einnimmt und ihr Anheben und das Eintauchen des Präparates störungsfrei ablaufen kann. Für die Konstruktion dieser Vorrichtung danke ich besonders Herrn M. Srejic (Zentralwerkstatt Biologie, Universität Düsseldorf). Die erzeugte isometrische Kraftentwicklung wurde fortlaufend registriert. Die in den Originalaufzeichnungen auftretenden vertikalen Ablenkungen in der Kraft sind mit dem

Lösungswechsel verbunden. Es sind Artefakte, die von dem Durchtritt der Präparate durch die Lösungsmitteloberfläche herrühren.

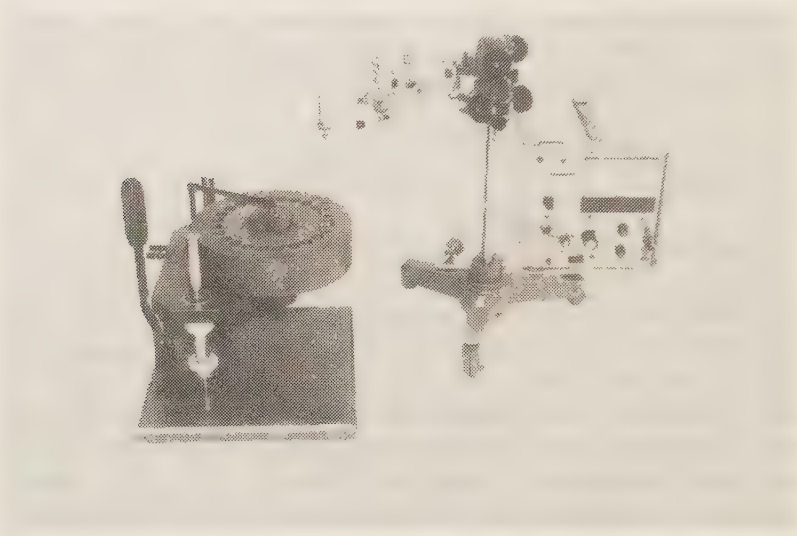

Abb. 3: Versuchsaufbau für die Messung der isometrischen Kraftentwicklung Links in der Fotografie die Inkubationseinheit; Bildmitte und rechts im Bild die Meßeinheit (Erläuterungen siehe Text)

### 2.2.2 Inkubationsmedien

Die Grundzusammensetzung aller verwendeten Inkubationsmedien war wie folgt: 45 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 6,8; 5 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$ bzw. 2 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$ und 10 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaN_3$. Die Molaritäten geben die Endkonzentrationen nach Zugabe aller weiteren Agenzien an.

Der im Folgenden als Erschlaffungspuffer bezeichnete Puffer enthielt zusätzlich noch 5 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA und 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP. Der als Kontraktionspuffer bezeichnete Puffer enthielt zu-

sätzlich 5 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA und 5 $mmol \cdot l^{-1}$ CaEGTA in einem Verhältnis von 3 : 7 und 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP. Für diese Lösung ergab sich ein pCa von 5 (s. 2.2.3).

### 2.2.3 Variation der freien $Ca^{2+}$-Konzentration

Für die Initiation der maximalen Kontraktion werden nur geringe $Ca^{2+}$-Konzentrationen (etwa $10^{-6}$ M) benötigt. Die Calciumverunreinigungen (ca. $10^{-5}$ M) vieler wäßriger Lösungen sind um ein Vielfaches höher. Um die Effizienz niedriger $Ca^{2+}$-Konzentrationen untersuchen zu können, wird ein $Ca^{2+}$-Puffer eingeführt. Mit dem $Ca^{2+}$-Puffer, bestehend aus EGTA und dem CaEGTA-Komplex, lassen sich freie $Ca^{2+}$-Konzentrationen im micromolaren Bereich einstellen und stabilisieren. Die $Ca^{2+}$-Titrationskurve läßt sich durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschreiben:

$$pCa = pK' + \log \frac{[EGTA]}{[CaEGTA]}$$

$pCa = -\log[Ca^{2+}]$; $pK' = -\log K'$; $K'$ = apparente Dissoziationskonstante

Sie ermöglicht die Berechnung von pCa bei gegebenen pK' und bei Kenntnis des molaren Konzentrationsverhältnisses der Pufferkomponenten. Als apparente Dissoziationskonstante wurde $K' = 4{,}3 \times 10^{-6}$ M (Ebashi et al. 1962, s. Ogawa, 1968) für pH 6,8 unter Berücksichtigung der Temperatur auf die Dissoziation eingesetzt.

Das molare Konzentrationsverhältnis der Pufferkomponenten läßt sich in Annäherung wie folgt berechnen (Jewell und Rüegg, 1966):

$$\frac{[EGTA]}{[CaEGTA]} \approx \frac{\text{Volumen einer EGTA Lösung}}{\text{Volumen einer CaEGTA Lösung}}$$

Voraussetzung ist, daß die EGTA- und CaEGTA-Lösung exakt äquimolare Mengen an EGTA respective $CaCl_2$ und EGTA enthalten. Substituiert man den Wert eines bestimmten Mischungsverhältnisses in die Henderson-Hasselbalch-Gleichung, so läßt sich die freie $Ca^{2+}$-Konzentration bestimmen.

Die EGTA-Lösung enthielt: 5 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA; 45 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 5 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$; 10 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaN_3$; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 6,8. Die CaEGTA-Lösung enthielt zusätzlich noch 5 $mmol \cdot l^{-1}$ $CaCl_2$. Zugegeben wurde $CaCl_2$ aus einer Stammlösung, deren Molarität exakt durch Titration gegen EGTA vorher bestimmt wurde.

### 2.2.4. EDTA-Behandlung der gehäuteten Fasern

Die Behandlung der gehäuteten Faserbündel mit 10 $mmol \cdot l^{-1}$ bzw. 20 $mmol \cdot l^{-1}$ EDTA in 40 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol pH 7,0 wurde nach Simmons und Szent-Györgyi (1978) durchgeführt. Für die Desensibilisierungsversuche an Faserbündeln von Sipunculus nudus wurden diese EDTA-haltigen Puffer auf 15° C bzw. 35° C temperiert. Die Inkubationsdauer variierte. Kontrollfasern zur Desensibilisierung wurden in EDTA-freiem Puffer gleicher Zusammensetzung bei ernöhter Temperatur inkubiert. Mit der EDTA-Behandlung verknüpft waren Prä- und/oder Postinkubation in Rigor-Lösung (45 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 6,8; 10 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaN_3$; 5 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$; 5 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA) und/oder in $Mg^{2+}$-freier Rigor-Lösung (45 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 6,8; 10 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaN_3$; 5 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA; s. Ergebnisteil).

### 2.2.5 Spezielle Inkubationszusätze

Das für die Kontraktionsexperimente eingesetzte Calmodulin, isoliert aus Stierhoden, wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. J.C. Rüegg (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Calmodulin aus Rinderhirn wurde von der Firma Serva bezogen. Koffein (1,3,7 - Trimethylxanthin) und

Chlorpromazin (CPZ; 2-Chloro-10-(3-dimethylaminopropyl)phenothiazin) stammten von der Firma Sigma. Trifluoperazin war ein Geschenk von Röhm Pharma (Weiterstadt). Die weiteren Agenzien und Enzyme wurden von der Firma Boehringer (Mannheim) geliefert.

Nach Zusatz der Agenzien zu den Inkubationsmedien wurde kontrolliert, ob sie eine Veränderung im pH-Wert bewirkten.

## 2.3 Auswertung der Kontraktionsexperimente

### 2.3.1 Bestimmung der $Ca^{2+}$-Sensitivität der Fasern

Die $Ca^{2+}$-Sensitivität ist hier der Prozentsatz der Inhibition der $Ca^{2+}$-sensitiven Kontraktion in Abwesenheit von $Ca^{2+}$ und wurde wie folgt berechnet:

$$1 - \frac{\text{Kraftentwicklung in pCa 8,0}}{\text{Kraftentwicklung in pCa 5,0}} \quad ( \times 100 )$$

### 2.3.2 Hill-Diagramm

Die Daten der $Ca^{2+}$-Dosis-Wirkungskurven wurden im sogenannten Hill-Diagramm auf kooperative Effekte hin analysiert (Cornisn-Bowden und Koshland, 1975). Im Hill-Diagramm wurde der Logarithmus des Quotienten (RT / 1 - RT) gegen den negativen dekadischen Logarithmus der $Ca^{2+}$-Konzentration aufgetragen, wobei RT die Kraftentwicklung relativ zur maximal induzierten Kraftentwicklung ist. Die maximal induzierte Kraft wurde gleich 1 gesetzt. Die Geradengleichung für das Hill-Diagramm lautet:

$$\log (RT / 1 - RT) = \log K + n_H \log \left[ Ca^{2+} \right]$$

Die Steigung der Geraden $n_H$ wird als Hill-Koeffizient bezeichnet. Bei halbmaximaler induzierter Kraftentwicklung wird

der Ausdruck log (RT / 1 - RT) gleich Null. Dadurch wird der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse beschrieben. Er charakterisiert die $Ca^{2+}$-Konzentration ($-\log[Ca^{2+}]_{50} = pCa_{50}$), die für die Induktion der halbmaximalen Kraftentwicklung benötigt wurde. Die Steigung in diesem Punkt wird vielfach als $n_{50}$ bezeichnet.

### 3. Präparation von Myofibrillen

Eine Myofibrillensuspension wurde hier durch vorsichtige Homogenisation der gehäuteten und glycerinextrahierten Fasern mit einem handgetriebenem Glas-Teflon-Homogenisator in Puffer (s. 6.1) hergestellt.

### 4. Präparation von Aktomyosin

Das frischpräparierte Muskelgewebe (s. 1.1.1) des HMS wurde im zehnfachen Volumen Waschlösung (10 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 6,5; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$; 0,1 $mmol \cdot l^{-1}$ PMSF; 20 $mmol \cdot l^{-1}$ 2-Mercaptoethanol; 100 $mg \cdot l^{-1}$ Streptomycin) homogenisiert und zweimal gewaschen. Dazu wurde der HMS mit der Schere zerkleinert, mit einem Messerhomogenisator und anschließend mit einem motorgetriebenem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert und 30 min zentrifugiert ( 20.000 x g). Für den zweiten Waschschritt wurde das Sediment mit einem Ultra-Turrax$^R$ suspendiert. Das Sediment des zweiten Waschschrittes wurde zur Extraktion des Aktomyosins in 0,5 M NaCl; 10 $mmol \cdot l^{-1}$ $KH_2PO_4$ pH 7,0; 5 $mmol \cdot l^{-1}$ 2-Mercaptoethanol mit einem Glas-Teflon-Homogenisator resuspendiert. Das Homogenat wurde für 25 min bei 4° C gerührt. Kurz vor der einstündigen Zentrifugation (30.000 x g) wurde dem Extrakt ATP (2 $mmol \cdot l^{-1}$) zugegeben. In dem erhaltenen Überstand mit den extrahierten Proteinen wurde die Salzkonzentration auf ein Viertel reduziert. Dazu wurden drei Volumen 30 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-Maleat-Puffer (pH 7,0) langsam unter Rühren hinzugegeben. Das derart ausgefällte Aktomyosin wurde abzentrifugiert (30 min; 20.000 x g), in Puffer ( 20 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 30 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-

Maleat pH 7,0; 5 mmol $l^{-1}$ 2-Mercaptoethanol) aufgenommen und über Nacht dagegen dialysiert. Diese und alle weiteren Isolierungen wurden bei 4° C durchgeführt.

## 5. Präparation von Myosin

Für die Isolierung wurden entweder Längs- und Ringmuskelschicht getrennt und separat aufgearbeitet oder der gesamte HMS als Ganzes aufgearbeitet. Die Gewebe wurden im zehnfachen Volumen Waschlösung (20 mmol·$l^{-1}$ KCl; 30 mmol·$l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 6,4; 0,5 mmol $l^{-1}$ $MgCl_2$; 0,1 mmol·$l^{-1}$ PMSF; 20 mmol·$l^{-1}$ 2-Mercaptoethanol, 100 mg·$l^{-1}$ Streptomycin) zweimal gewaschen. Dazu wurde das Gewebe zunächst mit einem Messerhomogenisator grob zerkleinert und dann mit einem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert. Jeder Waschschritt endete mit einer 30minütigen Zentrifugation (20.000 x g). Aus dem Sediment des zweiten Waschschrittes wurde Aktomyosin extrahiert. Es wurde dazu im zehnfachen Volumen Extraktionspuffer (0,5 M NaCl; 10 mmol·$l^{-1}$ $KH_2PO_4$ pH 7,0; 5 mmol·$l^{-1}$ 2-Mercaptoethanol) aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde für 25 min bei 4° C gerührt. Das extrahierte Aktomyosin wurde durch einen 60minütigen Zentrifugationsschritt (20.000 x g) von unlöslichen Proteinen getrennt. Kurz vor der Zentrifugation wurde noch 5 mmol·$l^{-1}$ ATP zugefügt. Danach wurden EGTA (0,1 mmol·$l^{-1}$), $MgSO_4$ (20 mmol·$l^{-1}$) und ATP (5 mmol·$l^{-1}$) zum Extrakt im Überstand hinzugegeben. Mit 40% Ammoniumsulfat(AMS)-Sättigung wurde das Aktomyosin aus dem Extrakt präzipitiert und anschließend abzentrifugiert (40 min; 20.000 x g). Während der Präzipitation wurde mit NaOH neutralisiert. Das im Überstand verbleibende Myosin wurde nun durch 60 % AMS-Sättigung ausgesalzt und ebenfalls durch Zentrifugation sedimentiert (30 min; 20.000 x g). Das Myosin enthaltende Sediment wurde in 20 mmol·$l^{-1}$ KCl; 30 mmol·$l^{-1}$ Tris-Maleat pH 7,0; 5 mmol·$l^{-1}$ 2-Mercaptoethanol aufgenommen, in der Ultrazentrifuge zentrifugiert, erneut in diesem Puffer suspendiert und über Nacht dagegen dialysiert. Die Präparationen von Aktomyosin und Myosin erfolgten in Anlehnung an D`Haese (1980) mit den freundlicherweise diskutierten Modifikationen

(D'Haese; persönl. Mitteilung).

## 6. EDTA-Behandlung der Myofibrillen, des Aktomyosins und des Myosins

### 6.1 Myofibrillen

Die EDTA-Behandlung der Myofibrillen war prinzipiell ähnlich der der gehäuteten Faserbündel. Die Myofibrillen wurden mit den gleichen Lösungen wie die Faserpräparate (s. 2.2.4) behandelt. Resuspension und Zentrifugation (je 20 min; 20.000 x g) waren analog dem Badwechsel. Zunächst wurde eine Myofibrillensuspension in Erschlaffungspuffer hergestellt (s. 3). Es folgten zwei Waschschritte, der erste in Rigor-Lösung und der zweite in $Mg^{2+}$-freier Rigor-Lösung (s. 2.2.4). Während der anschließenden 30minütigen Extraktion mit 10 $mmol \cdot l^{-1}$ EDTA bei 30° C wurde die Suspension ständig gerührt. Der Überstand mit den extrahierten Proteinen wurde in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon; Witten) eingeengt und dann gegen Erschlaffungspuffer dialysiert.

### 6.2 Aktomyosin und Myosin

Sedimentiertes Aktomyosin und Myosin wurde im zwanzigfachen Volumen Puffer (40 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl. 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 7,0; 0,1 mmol $l^{-1}$ EGTA) gewaschen, das heißt, im Glas-Teflon-Homogenisator suspendiert und anschließend sedimentiert (30 min; 20.000 x g). Die Niederschläge wurden in der gleichen Lösung, die auf 30° C vortemperiert wurde, resuspendiert, so daß die Proteinkonzentration 1-2 mg Aktomyosin/ml bzw. 0,5 mg Myosin/ml betrug. Einem Teil der Suspension wurde zusätzlich EDTA (10 $mmol \cdot l^{-1}$; Endkonzentration) zugegeben. Die Suspensionen wurden für 10 min bei 30° C inkubiert und dabei ständig gerührt. Die Suspensionen wurden danach bei 25° C zentrifugiert (10 min; 20.000 x g). Die aus dem Myosin extrahierten Proteine wurden mit 80% AMS-Sättigung gefällt und bei 20.000 x g (30 min) sedimentiert. Die sedimentierte Fraktion vom

Aktomyosin wurde dann prinzipiell nochmals der gleichen Behandlung unterworfen, allerdings erfolgte sie auf Eis, mit eisgekühlten Lösungen, und der Zentrifugationsschritt erfolgte bei 4° C in der Kühlzentrifuge. Die Überstände wurden in einer Amiconzelle eingeengt und gegen 20 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 30 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-Maleat pH 7,0; 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ 2-Mercaptoethanol dialysiert. Die erhaltenen Niederschläge mit Aktomyosin wurden wie anfangs gewaschen. Das Sediment wurde in 20 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl, 30 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-Maleat pH 7,0, 5 $mmol \cdot l^{-1}$ 2-Mercaptoethanol, 2 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$ aufgenommen und dagegen dialysiert. Das EDTA-behandelte Myosin wurde in 50 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 7,0, 50 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl, 4 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$ aufgenommen und dagegen dialysiert.

## 7. DTNB-Behandlung des Myosins - Isolierung der leichten Ketten des Myosins

Die Behandlung des Myosins mit DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Kendrick-Jones (1976). Sedimentiertes (30 min, 20.000 x g) Myosin (s. 5.1) wurde mit einer Proteinkonzentration von etwa 1 $mg \cdot ml^{-1}$ in 20 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 30 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-Maleat pH 7,0 resuspendiert und dann zentrifugiert (40 min; 20.000 x g). Das sedimentierte Myosin wurde anschließend in 40 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl; 30 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-HCl pH 8,5; 2 $mmol \cdot l^{-1}$ EDTA und 0,1 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA resuspendiert. Dann wurde DTNB (gelöst in 2 M Tris-HCl pH 8,0) mit einer Endkonzentration von 10 $mmol \cdot l^{-1}$ hinzugegeben. Die Suspension wurde 20 min auf Eis gerührt. Danach wurde mit 1 N Essigsäure auf pH 6,0 titriert. Die dadurch präzipitierten schweren Ketten des Myosins wurden abzentrifugiert (40 min; 20.000 x g). Dem Überstand des Zentrifugationsschrittes wurde 10 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$ und 1 $mmol \cdot l^{-1}$ DTT zugesetzt. Die DTNB-extrahierten Proteine wurden daraufhin mit 80% AMS-Sättigung gefällt. Das Präzipitat wurde gesammelt (40 min; 30.000 x g) und in 5 $mmol \cdot l^{-1}$ NaCl; 5 $mmol \cdot l^{-1}$ 2-Mercaptoethanol, 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-Maleat pH 6,8 (Chromatographiepuffer; s. 8) aufgenommen und über Nacht dagegen dialysiert.

## 8. Affinitätssäulenchromatographie - Reinigung der leichten Ketten

Die Affinitätssäulenchromatographie wurde unter Bezugnahme auf die Arbeit von Toste und Cooke (1979) duchgeführt. Die Säule (200 x 20 mm) wurde mit 50 ml Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia) gefüllt und mit 5 mmol·l$^{-1}$ NaCl; 5 mmol·l$^{-1}$ 2-Mercaptoethanol; 20 mmol·l$^{-1}$ Tris-Maleat pH 6,8; 0,02 % $NaN_3$ äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe - DTNB-Extrakt des isolierten Myosin (s. 7) in Chromatographiepuffer - wurde mit dem dreifachen Säulenvolumen gewaschen. Danach wurde mit hoher Ionenstärke (1,5 mol·l$^{-1}$ NaCl; 5 mmol·l$^{-1}$ 2-Mercaptoethanol; 20 mmol·l$^{-1}$ Tris-Maleat pH 6,8; 0,02 % $NaN_3$) mit einer Durchflußrate von 60 ml·h$^{-1}$ eluiert. Die Extinktion des Eluats wurde mit einem UV-Detektor registriert. Die Chromatographie wurde bei 4° C im Kühlraum durchgeführt.

Die Fraktionen wurden nach dem UV-Diagramm vereinigt. Die Proteine wurden anschließend nach Dialyse gegen 20 mmol·l$^{-1}$ KCl ; 30 mmol·l$^{-1}$ Tris-Maleat pH 7,0; 0,5 mmol·l$^{-1}$ 2-Mercaptoethanol mit 80% AMS gefällt und abzentrifugiert (40 min; 20.000 x g). Die Sedimente der Fraktionen wurden dann im gleichen Puffer aufgenommen und die Proteinlösungen dagegen dialysiert.

## 9. Präparation von Myosin, HMM und Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskulatur

Die Proteine wurden mir freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. J. D´Haese (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Das Myosin wurde nach einer Methode von Szent-Györgyi (1951) präpariert. Das HMM wurde nach den Methoden von Weeds und Taylor (1975) hergestellt. Die Isolierung des unregulierten Aktins erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Spudich und Watt (1971).

## 10. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch entweder nach dem Verfahren von Lowry et al. (1951) oder nach Bradford (1976) mit dem Bio-Rad-Proteintest bestimmt. Rinderserumalbumin diente als Standard.

## 11. Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität der extrahierten Proteine wurde in den im Ergebnisteil angegebenen Medien durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml. Nach generell 10minütiger Vorinkubation bei Zimmertemperatur wurde die Reaktion mit ATP (1 $mmol \cdot l^{-1}$) gestartet. Die Hydrolyse wurde mit 5% Trichloressigsäure nach 4 min gestoppt. Die Proben wurden anschließend in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das freigesetzte anorganische Phosphat wurde in einem Aliquot des Überstandes nach der Methode von Fiske und Subbarow (1925) bestimmt. Als Standard diente der Phosphatstandard von Sigma. Die ATPase-Aktivität wurde in nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$ angegeben.

Für die Bestimmung der ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der freien $Ca^{2+}$-Konzentration wurde eine CaEGTA/EGTA-Pufferreihe (s. 2.2.3) hergestellt. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität der ATPase-Aktivität des Aktomyosins berechnete sich analog der $Ca^{2+}$-Sensitivität der Faserbündel (s. 2.3.1).

## 12. Gleichgewichtsdialyse - Bindung von $Ca^{2+}$ an Myosin

Mittels der Gleichgewichtsdialyse sollte die Bindung von $Ca^{2+}$-Ionen an Myosin studiert werden. Die Gleichgewichtsdialyse wurde in einem Dianorm$^{R}$ Gleichgewichts-Dialyse-System (Bachofer, Reutlingen) durchgeführt. Die Mikro-Teflon-Dialysezellen (Zelltyp: Mikro 0,2) hatten ein Gesamtarbeitsvolumen von 400 ul. Durch eine semipermeable Membran (Diachema; Ausschlußgrenze MG 5000; Durchmesser: 63 mm) wurden die Zel-

len halbiert. In die eine Hälfte wurde 150 ul oder 180 ul Myosinlösung (2,1 - 3,8 mg/ml; in 50 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 6,8; 50 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 4 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$ und 10, 20 bzw. 25 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaPP_i$) pipettiert. Das Myosin war zuvor über Nacht gegen 50 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 7,0; 50 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 4 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$; 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ DTT dialysiert worden. Das Substratanalogon Pyrophosphat sollte die Löslichkeit des Myosins erhöhen (Josephs und Harrington, 1968). In die andere Hälfte der Zelle wurde das gleiche Volumen eines $^{40}Ca/^{45}Ca$EGTA/EGTA-Puffers (0,1 - 2 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA; 0,1 $mmol \cdot l^{-1}$ $^{40}Ca/^{45}Ca$; Endkonzentration) in 50 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 6,8; 50 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 4 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$ und 20 $mmol \cdot l^{-1}$ bzw. 25 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaPP_i$ pipettiert. Es wurden $Ca^{2+}$-Konzentrationen von $10^{-8}$ $mol \cdot l^{-1}$ bis $10^{-4}$ $mol \cdot l^{-1}$ eingesetzt. Medien mit höherer $Ca^{2+}$-Konzentration enthielten kein EGTA mehr. Ein Aliquot der Myosinlösung wurde zur Proteinbestimmung eingesetzt.

Die Dialysemembranen wurden für 1 h in 5 $mmol \cdot l^{-1}$ EDTA; pH 7,0 gekocht und in 5 $mmol \cdot l^{-1}$ EDTA und 0,02 % $NaN_3$ pH 7,0 bei $4^o$ C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden sie mit entmineralisiertem Wasser gespült und dann 15 min in Dialysepuffer (50 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 7,0; 50 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl, 4 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$; 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ DTT) getränkt.

Die Gleichgewichtsdialyse erfolgte 12 h bei $4^o$ C und 1 h bei Zimmertemperatur. Es wurde im Vorversuch kontrolliert, ob der Gleichgewichtszustand in den Dialysezellen erreicht war und ob die Aktivität und Sensitivität des Myosin unbeeinträchtigt war. Dazu wurde die durch verschiedene $Ca^{2+}$-Konzentrationen induzierte aktinaktivierte Myosin-ATPase-Aktivität nach der Gleichgewichtsdialyse gemessen und mit den Aktivitäten der nur kurz in den Reaktionsmedien inkubierten Proben verglichen.

In den Experimenten mit radioaktivem $^{45}Ca^{2+}$ (Amersham International, Großbritannien; spez. Aktivität von 17,4 mCi/mg $Ca^{2+}$) wurde die Verteilung der Radioaktivität in den Halbzellen gemessen. Der Inhalt der Halbzellen wurde mit 3 x 150 ul

3 $mol \cdot l^{-1}$ KCl direkt in die Zählgläschen gewaschen und in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 212; Zinsser Analytic GmbH) mit dem Beckman LS-8000 Flüssigkeits-Szintillations-Zähler gemessen.

## 13. Gelelektrophoretische Techniken

### 13.1 SDS-Polyacrylamid-Gradienten-Gelelektrophorese (SDS-PAGGE)

Die Gelelektrophorese wurde mit dem diskontinuierlichen Tris-Glycin (pH 8,8) und Tris-HCl (pH 6,8) Puffersystem mit SDS, zuerst beschrieben von Laemmli (1970) nach O'Farrell (1975), ausgeführt. Das Trenngel (Platte: 200 x 100 x 0,7 mm) hatte einen linearen Polyacrylamidgradienten von 9-17%. Die Gele wurden in der Pharmacia GSC-2 Gießapparatur gegossen, mit 20% Äthanol überschichtet und mit 40% Saccharose unterschichtet. Die Polymerisation erfolgte bei Zimmertemperatur. Das Sammelgel wurde mit einer Spritze aufgetragen. In das Sammelgel wurden Probentaschen geformt. Die gelelektrophoretische Trennung (Pharmacia GE 2/4 LS) dauerte 5-6 h bei 500 Volt konstanter Spannung. Der Laufpuffer enthielt 0,025 $mol \cdot l^{-1}$ Tris; 0,192 $mol \cdot l^{-1}$ Glycin pH 8,3; 0,1 % SDS. Die Proben waren in 10% Glycerin; 2,3% SDS; 5% 2-Mercaptoethanol; 0,0625 $mol \cdot l^{-1}$ Tris-HCl pH 6,8; 0,002% Bromphenolblau gelöst. Die Gele wurden in 50%iger Trichloressigsäure mit 0,1% SERVA Blau G fixiert und gefärbt. Entfärbt wurde in 7%iger Essigsäure, in der die Gele bis zur Ablichtung aufbewahrt wurden.

### 13.2 Pyrophosphatextraktion des Myosins und elektrophoretische Isolierung des Myosins in der Pyrophosphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Extraktion des Myosins und die elektrophoretische Isolierung des Myosins in der Pyrophosphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde modifiziert nach Silver und Stull (1983) durchgeführt.
Die gehäuteten Faserbündel wurden mit eisgekühltem Na-Pyro-

phosphat-Extraktionspuffer (100 mmol·l$^{-1}$ $NaPP_i$ pH 8,8; 5 mmol·l$^{-1}$ EGTA; 10% Glycerin; 1 mmol·l$^{-1}$ PMSF; 15 mmol·l$^{-1}$ 2-Mercaptoethanol) behandelt. Dazu wurden die Faserbündel in einem 2 ml Handhomogenisator (Glasbläser, Universität Düsseldorf) im zwanzigfachen Volumen Extraktionspuffer homogenisiert. Der Extrakt wurde dann 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 20 min bei 7.000 x g und 4° C zentrifugiert. Zu dem Überstand mit den extrahierten Proteinen wurde 40%ige Saccharoselösung gegeben. Aliquote des Überstandes wurden auf die Pyrophosphatgele aufgetragen.
Die Elektrophoresedauer in den homogenen Rundgelen (80 x 6 mm Innendurchmesser, 3,3 % PA) wurde auf 3,5 - 15 h bei 70 - 90 V konstanter Spannung ausgedehnt. Die Elektrophorese wurde in der Kühlzelle bei 4° C mit zirkulierendem Kühlbad durchgeführt.

Für die zweite Dimension in der SDS-PAGGE wurden die Rundgele mit den Applikationströgen von Pharmacia auf den Plattengelen ausgerichtet und in 1%igem Agarosegel für den Lauf eingebettet.

## III. ERGEBNISSE

### 1. Beschreibung der isometrischen Kontraktion

### 1.1 $Ca^{2+}$-Sensitivität der Faserbündel

Nach der Häutung waren die Faserbündel der longitudinalen Muskulatur und des Retractors von Lipostomum nodus, dem Kontraktionsvermögen nach zu urteilen, permeabel für $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, EGTA und ATP. Nachdem sie in der Meßanordnung eingespannt waren, erschlafften sie in dem Erschlaffungspuffer. Inkubierte man anschließend in einem CaEGTA/EGTA-Puffer mit relativ hoher freier $Ca^{2+}$-Konzentration (pCa 5,0), kontrahierten die Faserbündel innerhalb von 1,5 bis 2,5 min maximal und entwickelten eine Kraft von etwa 1,5 kg/cm$^2$. Im Erschlaffungspuffer nahm die Kraft wieder rasch ab und kam auf das Ausgangsniveau zurück. Die $Ca^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung war reversibel und ließ auf die Präsenz von $Ca^{2+}$-sensitiven Bindungsstellen schließen. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität wurde unter diesen Bedingungen gleich 1 gesetzt. Weitere Kontraktions-Erschlaffungs-Zyklen ließen sich auslösen.

### 1.2 Der $Q_{10}$ der Kraftentwicklung

Die Geschwindigkeit der $Ca^{2+}$-induzierten Kraftentwicklung bei 15° C, gemessen bei halbmaximaler Kraftamplitude, betrug 6,1 ± 2,1 mN/min (n = 25). Bei 25° C war die Kraftentwicklung pro Zeiteinheit erhöht und lag bei 21,3 ± 1,3 mN/min (n = 3). Für den Temperaturkoeffizienten $Q_{10}$ errechnete sich aus den Mittelwerten ein Wert von 2,3. Das bedeutet, daß die Reaktionen, die der Kraftentwicklung zugrunde liegen, in dem gewählten Temperaturbereich derart beeinflußt wurden, daß ihre Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Erhöhung um 10° C mehr als verdoppelt wurden. Es ließ sich daraus auch schließen, daß die Versuchstemperatur von 15° C, d.h., etwa die mittlere Temperatur des Lebensraums der hier verwendeten Tiere, nahe im optimalen Temperaturbereich dieser Reaktionen lag.

## 2. Die Abhängigkeit der isometrischen Kraftentwicklung der gehäuteten Fasern von der freien $Ca^{2+}$-Konzentration

Das Faserbündel, eingespannt in der Meßanordnung, wurde zunächst erschlafft und dann in Folge in CaEGTA/EGTA-Puffern mit steigenden freien $Ca^{2+}$-Konzentrationen inkubiert. Nach jeder Konzentrationsänderung wurde abgewartet, bis sich eine maximale stabile Kraft eingestellt hatte (s. Abb. 4), bevor die $Ca^{2+}$-Konzentration erhöht wurde. Die freie $Ca^{2+}$-Konzentration wurde von 1 x $10^{-8}$ mol·l$^{-1}$ bis 1 x $10^{-4}$ mol·l$^{-1}$ $Ca^{2+}$ variiert.

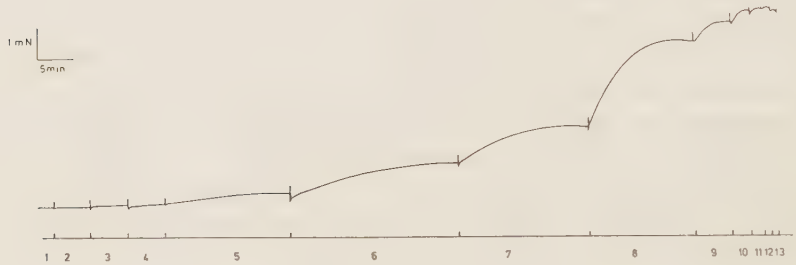


Abb. 4: Originalaufzeichnung der Kraftentwicklung eines gehäuteten Faserpräparates bei steigender freier $Ca^{2+}$-Konzentration. Die Inkubationsmedien wurden numeriert und ihr Wechsel wurde durch die senkrechten Striche angedeutet. Die Ca-Konzentration (pCa) in den Inkubationsmedien war wie folgt: 1 , pCa 8,0; 2 , pCa 6,6; 3 , pCa 6,3; 4 , pCa 6,1; 5 , pCa 5,9; 6 , pCa 5,8; 7 , pCa 5,7; 8 , pCa 5,6; 9 , pCa 5,5; 10 , pCa 5,45; 11 , pCa 5,3; 12 , pCa 5,2; 13 , pCa 5,1.

Für die Auftragung der Kraftentwicklung in Abhängigkeit von der $Ca^{2+}$-Ionenkonzentration wurden die Antworten von mehreren Faserbündeln normiert und die jeweils maximal induzierte Kraftentwicklung gleich 1 gesetzt. Die maximal induzierte Kraftentwicklung war erreicht, wenn durch weitere Erhöhung

der freien $Ca^{2+}$-Konzentration keine zusätzliche Kraftzunahme erreicht werden konnte. Die Kontraktionen wurden als relative Kraftentwicklung (RT) gegenüber der maximalen Kraftentwicklung (1) gegen pCa = $-\log[Ca^{2+}]$ aufgetragen.

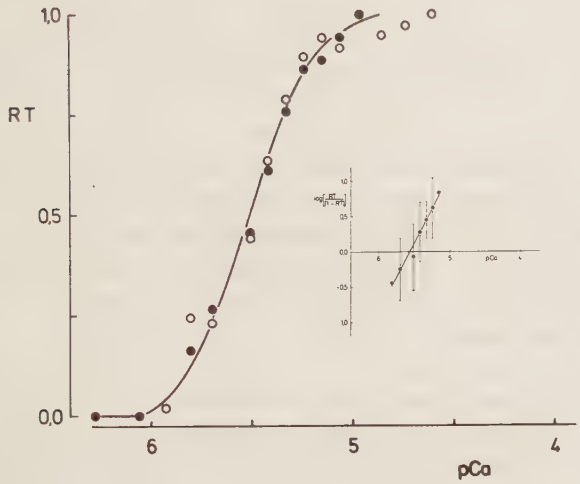


Abb. 5: Abhängigkeit der relativen isometrischen Kraftentwicklung der gehäuteten Faserbündel aus der Längsmuskulatur von der freien $Ca^{2+}$-Konzentration (pCa = $-\log[Ca^{2+}]$; RT , relative Kraftentwicklung);
geschlossene Kreise: 30 min Triton-X-100-Behandlung
offene Kreise : 3 h Triton-X-100-Behandlung
Rechts: Hill-Diagramm der dargestellten Beziehung

Es ergab sich eine steile sigmoide Dosis-Wirkungskurve (s. Abb. 5), die über etwa eine pCa-Einheit ansteigt. Das heißt, etwa eine Verzehnfachung der $Ca^{2+}$-Konzentration, hier im micromolaren Bereich, induzierte bereits eine maximale Kraftentwicklung.

Bis zu einer $Ca^{2+}$-Konzentration von $7,9 \times 10^{-7}$ $mol \cdot l^{-1}$ (pCa 6,1) war die Kraftentwicklung zu 100% gehemmt. Maximale

Kraftentwicklung wurde etwa bei 1,0 x $10^{-5}$ mol· $l^{-1}$ $Ca^{2+}$ (pCa 5,0) erreicht. Zur Quantifizierung der sich andeutenden Kooperativität und zur Bestimmung des $pCa_{50}$ wurde die Hill-Diagramm-Analyse durchgeführt. Für das Hill-Diagramm (s. 2.3.2), wurden Werte von RT = 0,1 bis RT = 0,9 genommen. In der linearen Regression ergab sich im Hill-Diagramm für diesen Wertebereich eine gute Korrelation, mit einem Korrelationskoeffizienten von r = 0,99 ± 0,005. Der $n_{50}$ lag bei 3,2 ± 0,4 (n = 5). Über einen weiten Bereich der Konzentrationsänderung liegt also eine positive Kooperativität vor. Der $pCa_{50}$ lag bei 5,5 ± 0,13 das heißt, die $Ca^{2+}$-Konzentration, bei der eine halbmaximale Kraftentwicklung erreicht wurde, betrug im Mittel 3,2 x $10^{-6}$ mol·$l^{-1}$ $Ca^{2+}$ (s. Abb. 5). Die Differenz zwischen $pCa_{10}$ und $pCa_{90}$ betrug 0,5 bis 0,7 pCa-Einheiten. Um die relative Kraftentwicklung von 10% auf 90% zu erhöhen, war eine 3- bis 5fache Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration ausreichend.

Das isolierte System war also im Bereich physiologischer intrazellulärer $Ca^{2+}$-Konzentrationen und möglicher Konzentrationsänderungen hoch $Ca^{2+}$-sensitiv, und die durch zunehmende $Ca^{2+}$-Konzentrationen induzierte Interaktion war positiv kooperativ.

Die Ausdehnung der Triton-X-100-Behandlung von 30 min auf 3 Stunden beeinflußte die relative Kraftentwicklung der Längsfaserbündel und die Regulation offenbar nicht (s. Abb. 5). Auch blieb eine längere Aufbewahrung der Faserbündel in dem Glycerin-Puffergemisch bei +4° C oder bei -20° C ohne Einfluß auf die pCa-abhängige Kraftänderung.

Wurden die gleichen Messungen an Retraktorfaserbündeln durchgeführt und wurde die relative Kraftentwicklung als Funktion der freien $Ca^{2+}$-Konzentration aufgetragen, stieg die pCa-Spannungskurve ebenfalls etwa innerhalb einer pCa-Einheit an. Für 30 min Triton X-100 behandelte Faserbündel war $n_{50}$ = 4,4 ± 0,5 (n = 2) und für 3 Stunden in Triton X-100 inkubierte Faserpräparate betrug der $n_{50}$ = 4,5 ± 0,8 (n = 3). Der $pCa_{50}$ lag bei 5,6 ± 0,1 bzw. bei 5,7 ± 0,03. Für die

Induktion der halbmaximalen Kraft war also eine $Ca^{2+}$-Konzentration von durchschnittlich 2,5 x $10^{-6}$ mol·$l^{-1}$ bzw. 2,0 x $10^{-6}$ mol·$l^{-1}$ erforderlich. Maximale Kraft wurde bei 1,0 x $10^{-5}$ mol·$l^{-1}$ bzw. bei 7,9 x $10^{-6}$ mol·$l^{-1}$ $Ca^{2+}$ erreicht. Die Schwellenkonzentrationen der Kraftentwicklung lagen bei etwa 2,3 x $10^{-7}$ mol·$l^{-1}$ $Ca^{2+}$. Die pCa-Spannungskurven waren steiler als die der Längsfaserbündel. Um die relative Kraftentwicklung von 10% auf 90% zu erhöhen war nur eine etwa 2- bis 3fache Steigerung der $Ca^{2+}$-Konzentration im micromolaren Bereich notwendig.

Waren die applizierten $Ca^{2+}$-Konzentrationen höher, als die für die Induktion der maximalen Kraft benötigte $Ca^{2+}$-Konzentration, wurde ein Dekrement in der Kraftentwicklung beobachtet.

Um zu überprüfen, ob die jeweilige Vorinkubation in $Ca^{2+}$-haltigen Puffern bei der sukzessiven Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration in einem Präparat ohne Auswirkungen auf die Ca-Abhängigkeit der Kraftentwicklung blieb wurde zum Vergleich die Abhängigkeit der Kraftentwicklung von der freien $Ca^{2+}$-Konzentration noch auf eine andere Art und Weise ermittelt. Es sollte gezeigt werden, daß mit den gleichen freien $Ca^{2+}$-Konzentrationen an einem jeweils anderen Faserpräparat die gleiche relative Kraftentwicklung auslösbar ist. Voraussetzung dafür war die Gewinnung vergleichbarer Faserbündel. Zum einen mußten sie untereinander den gleichen Durchmesser haben und zum anderen waren Ausgangslänge und Vordehnung entscheidend. Ein gesamtes Längsmuskelband wurde dazu aus dem HMS herausgelöst. Das Herauslösen war durch die Häutung erleichtert. Das Muskelband wurde in 10 mm lange Stücke geschnitten, die, in die Anordnung gebracht, jeweils um den gleichen Betrag vorgedehnt wurden. Jedes dieser Faserbündelstücke wurde nun in einen der CaEGTA/EGTA-Puffer getaucht, die Spannungsentwicklung registriert und die Werte relativ zur maximal in der Bündelpopulation induzierbaren Kraftentwicklung aufgetragen (s. Abb. 6). Die zu einer Population gehörenden Bündelstücke stammten zum einen Teil aus demselben Längsmuskelband und zum anderen Teil aus den be-

nachbarten Längsmuskelbändern desselben HMS. Die erhaltene pCa-Spannungskurve deutet in ihrer Steilheit wie die Kurve in Abb. 5 auf positive Kooperativität hin. Der $n_{50}$ betrug 2,6 ± 0,9 (n = 3) und $pCa_{50}$ lag bei 5,3 ± 0,1.

Die jeweils vorangehende Inkubation der Faserbündel in geringer konzentriertem CaEGTA/EGTA-Puffer blieb also scheinbar ohne größere Auswirkungen auf die pCa-abhängige Kraft. Eine Verschiebung der pCa-Spannungskurve zu geringeren pCa-Werten deutet sich allerdings an. Ein geringer Anteil der $Ca^{2+}$-Ionen könnte durch intrafibrilläres EGTA der $Ca^{2+}$-freien Faserbündel und durch Proteinanionen gepuffert werden und die aktuelle $Ca^{2+}$-Konzentration senken, so daß etwas höhere $Ca^{2+}$-Konzentrationen benötigt werden, um die gleiche relative Kraft zu erhalten.

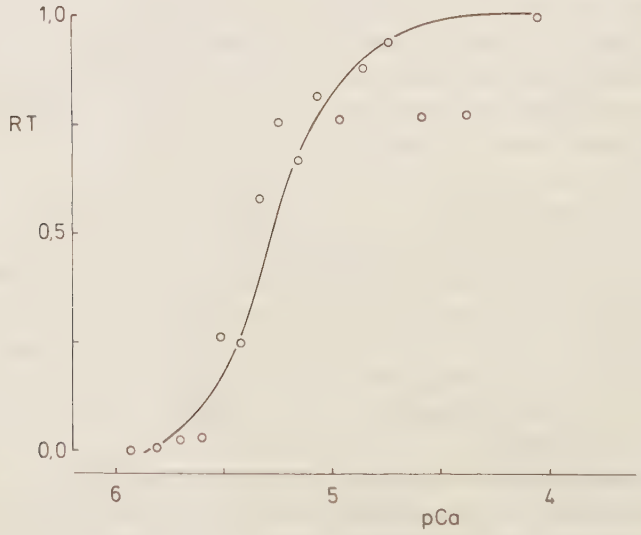


Abb. 6: Einfluß der freien $Ca^{2+}$-Konzentration auf die Kraftentwicklung differenter vergleichbarer Faserbündel (Erklärung s. Text); RT, relative Kraftentwicklung

### 3. Koffeininduzierte Kontraktionen

Wie zuvor beschrieben, war das kontraktile System nach der Häutung sensitiv gegenüber Calciumionen im Medium. Die intrazelluläre $Ca^{2+}$-Konzentration wird beim Skelettmuskel im Kontraktions-Erschlaffungszyklus durch membranpotentialabhängige Freisetzung und aktive Aufnahme des $Ca^{2+}$ durch das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) kontrolliert.

Mit Koffein läßt sich in Muskelgeweben, wie z.B. im Vertebratenskelettmuskel (Lüttgau und Oetliker, 1968; Wendt & Stephenson, 1983) und Herzmuskel (Endo et al., 1980 ; Wendt & Stephenson , 1983; Hess & Wier, 1984), im glatten Muskel der Vertebraten (Endo et al.,1980; Itoh et al., 1981; Itoh et al., 1982, Saida, 1982; Saida & van Breemen, 1984) und der Invertebraten (Twarog & Muneoka, 1973) unter bestimmten Voraussetzungen eine Kontraktion auslösen. Koffein durchdringt dabei bei intakten Präparaten leicht (Bianchi, 1962) die Zellmembran, ohne zu depolarisieren und scheint in normal permeablen und in artifiziell verändert permeablen Präparaten auf die Vesikel des SR einzuwirken. Sequestriertes $Ca^{2+}$ soll dabei freigesetzt werden und zu einer Kontraktion führen (Weber & Herz, 1968; Stephenson, 1981). Diese Wirkung des Koffein setzt ein funktionell intaktes $Ca^{2+}$-beladenes SR voraus. Eine direkte Wirkung von Koffein auf die $Ca^{2+}$-Sensitivität der Myofilamente wurde von Wendt & Stephenson (1983) sowie von Fabiato & Fabiato (1976) gefunden.

Es wurde nun hier untersucht, ob die Längsfaserbündel von Sipunculus nudus mit Koffein stimulierbar sind und ob sich bei längerer Inkubation in Triton X-100 eine Reduktion der koffeininduzierten Kraftentwicklung ergibt als mögliches Indiz für membranumschlossene $Ca^{2+}$-Speicher und deren Beeinträchtigung.

Dazu wurden die Faserpräparate unterschiedlich lange in Triton X-100 (1%; Häutungslösung) inkubiert. Die Glycerinextraktion entfiel. Vor der Inkubation in Koffein (20 $mmol \cdot l^{-1}$) in Erschlaffungspuffer wurden die Faserbündel einem Kontrak-

tions-Erschlaffungs-Zyklus unterworfen, um die Beladung der Präparate mit $Ca^{2+}$ zu vereinheitlichen. Nach maximaler Kraftentwicklung bei einem pCa von 5,0 wurden die Präparate 3 min bei pCa 8,0 erschlafft, dann wurde Koffein (20 $mmol \cdot l^{-1}$) in einem Aliquot dieses Puffers appliziert.

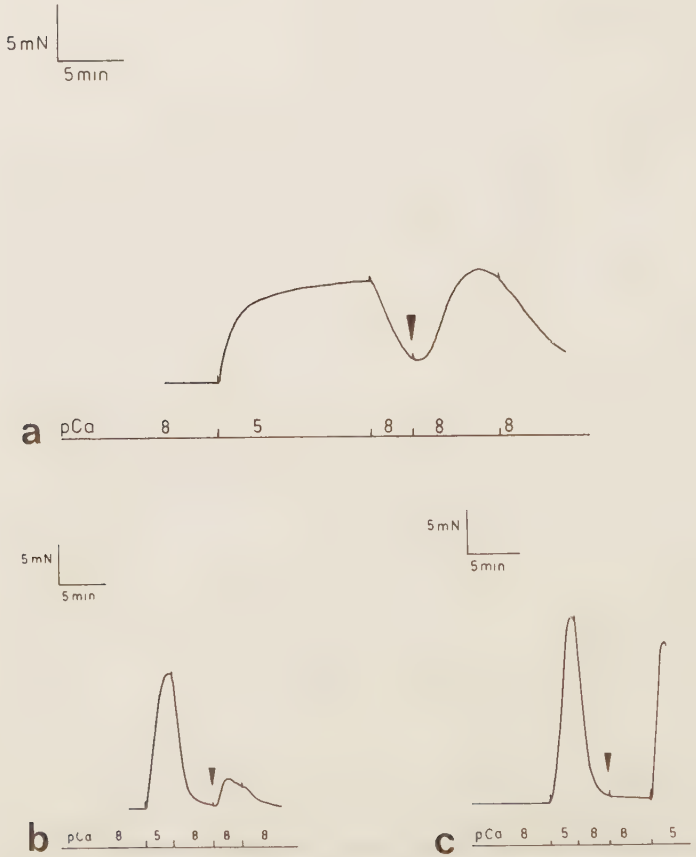


Abb. 7: Koffeininduzierte Kraftentwicklung in Erschlaffungspuffer nach einem Kontraktions-Erschlaffungszyklus

a) Kontrolle: ohne Behandlung in Triton X-100

b) 30 min Behandlung in Triton X-100

c) 120 min Behandlung in Triton X-100

Die Pfeilspitze markiert jeweils den Wechsel zum koffeinhaltigen (20 $mmol \cdot l^{-1}$) Erschlaffungspuffer.

Wie in Abb. 7 a gezeigt ist, führte Koffein in der Kontrolle (ohne Triton-X-100-Behandlung) - in dem allerdings in der Zeit von 3 min nicht vollständig erschlafften Faserbündel - zu einer fast so hohen Kontraktion (RT = 0,88) wie die Zugabe einer $Ca^{2+}$-Konzentration von 1,0 x $10^{-5}$ mol·$l^{-1}$. Nach 30-minütiger Behandlung mit Triton X-100 war die koffeininduzierte Kraftentwicklung im Vergleich zur vorangehenden Kontraktion verringert (RT = 0,22; s. Abb. 7, b). Nach 1,5 Stunden ließ sich eine koffeininduzierte Kraftentwicklung nicht mehr nachweisen (s. Abb. 7, c und Abb. 8). In Abb. 8 wurden die Ergebnisse zusammengefaßt dargestellt.

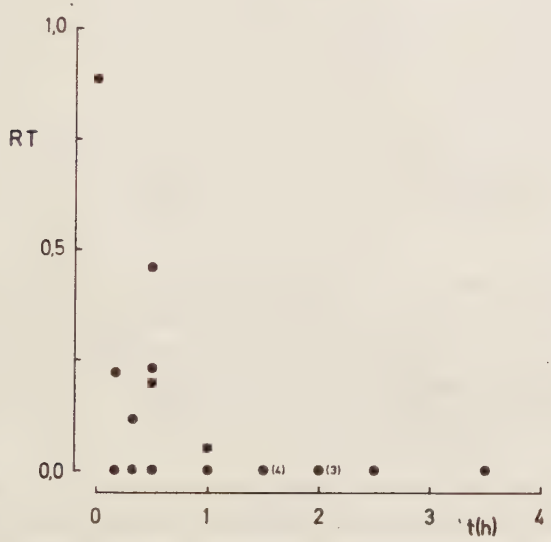


Abb. 8: Relative Kraftentwicklung, induziert durch 20 mmol·$l^{-1}$ Koffein in Erschlaffungspuffer, der unterschiedlich lang (0 - 3,5 h) in 1% Triton-X-100-behandelten Faserbündel. Die jeweils zuvor in der Faserpräparation mit Kontraktionspuffer ausgelöste Kraftentwicklung wurde gleich 1 gesetzt. Die Zahlen in Klammern geben die von 1 abweichende Anzahl an Experimenten an.

Es konnte gezeigt werden, daß in $Ca^{2+}$-freier Lösung mit Koffein eine Kontraktion auszulösen ist. Die Längsfaserbündel von Sipunculus nudus besitzen demnach koffeinsensitive Stel-

len. Diese Stellen verlieren mit zunehmender Benandlung mit Triton - X-100 an Effektivität und sind schließlich nicht mehr über eine Kraftinduktion nachzuweisen (s. Abb. 8).

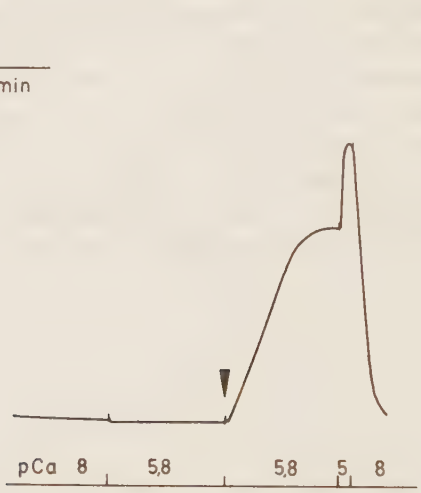


Abb. 9: Originalaufzeichnung der koffeininduzierten Kraftentwicklung in einem Puffer mit submaximaler $Ca^{2+}$-Konzentration (pCa 5,8; Pfeilspitze) eines in pCa 8,0 erschlafften und in pCa 5,8 präinkubierten Faserbündels. Das Experiment wurde mit einer Kontraktion in Kontraktionspuffer abgeschlossen.

Für eine weitere Serie von Experimenten wurden die Fasern zunächst in Erschlaffungspuffer erschlafft und anschließend in submaximaler $Ca^{2+}$-Konzentration (pCa 5,8) inkubiert. Die submaximale $Ca^{2+}$-Konzentration (pCa 5,8 = 1,6 x $10^{-6}$ mol·$l^{-1}$) führte in den beiden dargestellten Serien zu einer zwar innerhalb der Serien gleichen, aber im Vergleich zwischen den Serien unterschiedlichen Kraftentwicklung (RT = 0 bzw. RT = 0,55 $\pm$ 0,07). Die Differenz in der Kraftamplitude beruhte wahrscheinlich auf den hohen Unterschieden in der mechanischen Antwort, wie sie besonders in dem Bereich hoher Kooperativität bei der Ermittlung der pCa-Spannungsbeziehung auftraten. Lag ein konstanter Kontraktionszustand vor, wurden die Faserbündel in den gleichen Puffer, nur jetzt mit Koffein

(20 $mmol \cdot l^{-1}$), getaucht. Wie in Abb. 9 zu erkennen ist, konnte mit Koffein eine sofort einsetzende Kraftzunahme erreicht werden, die durch pCa 5,0 noch gesteigert wurde. Der Koffeineffekt war groß, wenn die submaximale $Ca^{2+}$-Konzentration in den Faserbündeln nicht zu einer Kraftentwicklung (RT = 0) geführt hatte. Er war geringer, wenn allein mit $Ca^{2+}$ ($1,6 \times 10^{-6}$ $mol \cdot l^{-1}$; pCa 5,8) bereits eine hohe relative Kraftentwicklung (RT = 0,55 $\pm$ 0,07) erzielt worden war (s. Abb. 10 + 11).

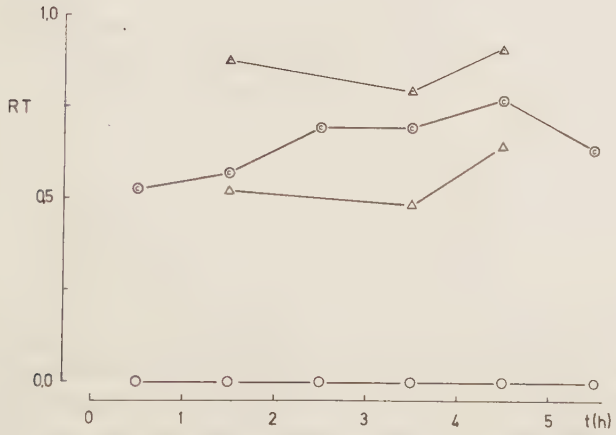


Abb. 10: Relative Kraftentwicklung von unterschiedlich lang (0,5-5,5 h) in 1% Triton-X-100-behandelten Faserbündeln induziert durch 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Koffein (gekennzeichnet durch C) bei einem pCa von 5,8. Kreise und Dreiecke kennzeichnen zwei verschiedene Präparationen. Die nicht mit einem C versehenen Symbole geben die relative Kraftentwicklung der Faserbündel ohne Koffein an. Die anschließend in dem Präparat ausgelöste (bei pCa 5,0) Kraftentwicklung wurde gleich 1 gesetzt.

Diese koffeininduzierte Kraftänderung war offenbar unabhängig von der Vorbehandlung der Fasern in Triton X-100. Selbst nach 5,5stündiger Behandlung war Koffein noch gleich effizient (s.

Abb. 10). Deshalb ist es möglich, daß hier eine direkte Wirkung von Koffein auf den kontraktilen Apparat vorliegt und Koffein dessen $Ca^{2+}$-Sensitivität erhöht (s. Abb. 11).

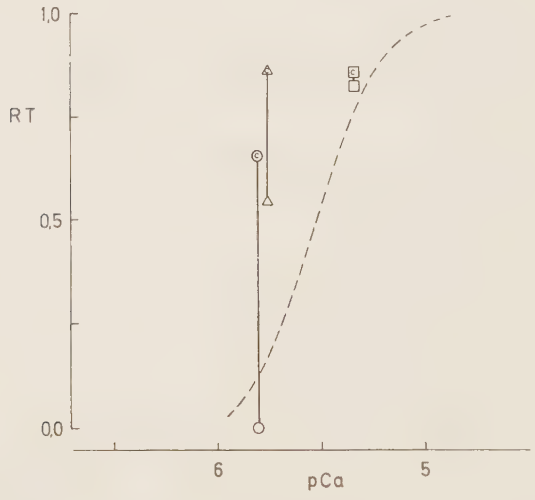


Abb. 11: Die mittlere relative Kraftentwicklung bei pCa 5,8 (Kreise und Dreiecke) und pCa 5,3 (Vierecke), induziert durch koffeinfreien und koffeinhaltigen $Ca^{2+}$-Puffer ( C ) wurde in Abhängigkeit vom pCa aufgetragen. Die in Abb. 5 dargestellte Dosis-Wirkungskurve wurde eingezeichnet (- - - - -), um die Interpretation einer scheinbaren Erhöhung der $Ca^{2+}$-Sensitivität manifest zu machen.

## 4. Einfluß von cAMP auf die Kraftentwicklung

Wie die $Ca^{2+}$-Ionen ist zyklisches Adenosin-3′:5′-monophosphat (cAMP) ein universeller Botenstoff. cAMP wirkt auf Proteinkinasen ein. Die Myosinkinase wird durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert (Adelstein et al., 1980; Conti & Adelstein, 1981). Die phosphorylierte Form der Myosinkinase hat nur geringe Affinität zu Calmodulin. Ihre Aktivität wird deshalb durch die Phosphorylierung gesenkt. Infolgedessen wird mit cAMP wegen der abnehmenden Phosphorylierung der

leichten Ketten die Aktin-Myosin-Wechselwirkung reduziert (Mrwa et al., 1979; Silver & DiSalvo, 1979), und die $Ca^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung nimmt ab (Rüegg et al., 1981; Meisheri & Rüegg, 1983). Über diesen Wirkungsmechanismus wird u.a. der Antagonismus von cAMP zu $Ca^{2+}$ in der Regulation der Muskelkontraktion in der glatten Vertebratenmuskulatur erklärt.

Bei den gehäuteten Fasern vom Mollusken-"catch"-Muskel wirkt cAMP auf einen muskelmechanisch "catch"-ähnlichen Zustand auflösend ein (Pfitzer & Rüegg, 1982). Eine cAMP-abhängige Proteinkinase soll über den Phosphorylierungsgrad des Paramyosins Einfluß nehmen (Achazi, 1979).

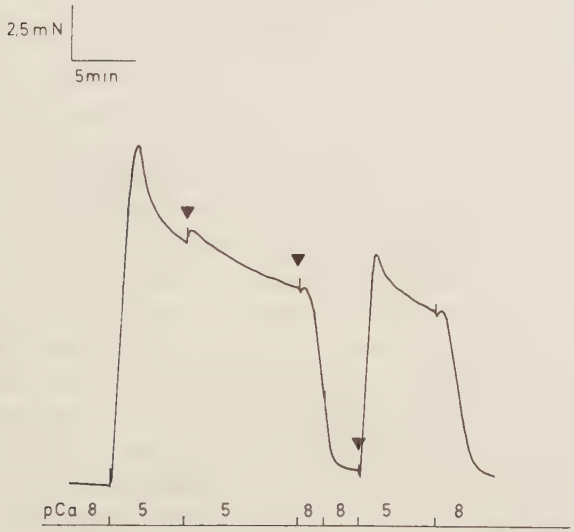


Abb. 12: Wirkung von cAMP ($10^{-4}$ mol·$l^{-1}$) auf die Kontraktilität und die Erschlaffung eines gehäuteten Längsfaserbündels von Sipunculus nudus - Die Dreiecke markieren den Wechsel zu cAMP-haltigen Puffern.

Hier sollte nun untersucht werden, ob cAMP einen Einfluß auf die Kontraktion in den Faserbündeln von Sipunculus nudus hat. In den gehäuteten Fasern wurde zunächst mit pCa 5,0 eine Kontraktion hervorgerufen. Die Zugabe von $10^{-4}$ mol·$l^{-1}$ cAMP hatte keinerlei Effekt auf den $Ca^{2+}$-induzierten Spannungszustand. Die Erschlaffung der Fasern blieb ebenfalls von cAMP unbeeinflußt. Auch die folgende Induktion der Kraftentwicklung durch $Ca^{2+}$ wurde nicht beeinflußt (s. Abb. 12).

## 5. Versuche zum indirekten Nachweis der Existenz einer $Ca^{2+}$-calmodulinabhängigen Myosinkinase

### 5.1 Effekte von Calmodulin und calmodulinspezifischen Inhibitore

#### 5.1.1 Die Wirkung von Calmodulin

Einer der intrazellulären Rezeptoren für das $Ca^{2+}$ ist das Calmodulin (CaM; Cheung, 1970). Die $Ca^{2+}$-Bindung führt zu einer Konformationsänderung, die die Bildung eines aktiven $Ca^{2+}$-CaM-Enzymkomplexes erlaubt. Die Myosinkinasen des Skelett- und Herzmuskels sowie der glatten Muskulatur der Vertebraten sind $Ca^{2+}$-CaM-abhängige Enzyme (Blumenthal & Stull, 1980). Sie phosphorylieren die leichten Ketten des Myosins, die deshalb als P-LC bezeichnet werden. Für die glatte Muskulatur der Vertebraten wurde gezeigt, daß die $Ca^{2+}$-CaM-abhängige Phosphorylierung der leichten Ketten das Ausmaß der $Ca^{2+}$-abhängigen ATPase-Aktivität des isolierten Aktomyosins (Gorecka et al., 1976; Chacko et al., 1977) und der Kraftentwicklung von Faserpräparaten verändert (Stull et al., 1977). Auch für einige Invertebratenmuskeln wurde eine $Ca^{2+}$-abhängige Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins gefunden (Sellers, 1981; Kerrick & Bolles, 1982).

In den folgenden Experimenten sollte ein Einfluß von CaM auf die Kraftentwicklung der gehäuteten Fasern von Sipunculus nudus untersucht werden, dazu wurde CaM den Inkubationsmedien zugegeben. Es wurde angenommen, daß in den gehäuteten Faserbündeln nach 30minütiger Triton-X-100-Behandlung und kurzzei-

tiger Glycerinextraktion noch eine präparateigene Myosinkinase vorhanden sei. Zum Vergleich und zum Austesten der biologischen Wirksamkeit des Calmodulins wurden die Experimente auch an gehäuteten Faserpräparaten der glatten Muskulatur vom Rattenuterus durchgeführt. Janis et al. (1981) konnten für intakte Präparate vom Myometrium des Rattenuterus eine vom Kontraktionszustand abhängige reversible Phosphorylierung der leichten Ketten demonstrieren. Das ließ die Annahme zu, daß gehäutete Fasern aus diesem Gewebe für vergleichende Experimente brauchbar seien.

Die Experimente machten sich die Erhöhung der $Ca^{2+}$-Sensitivität von Aktomyosin-ATPase-Aktivität und Kraftentwicklung durch Erhöhung der CaM-Konzentration bei calmodulinverarmten Präparationen zunutze (Sparrow et al., 1981). Kerrick et al. (1981) zeigten, daß die Zugabe von CaM zu gehäuteten Faserbündeln vom glatten Vertebratenmuskel, bei submaximaler $Ca^{2+}$-Konzentration, zu einer Zunahme der Kontraktion führte.

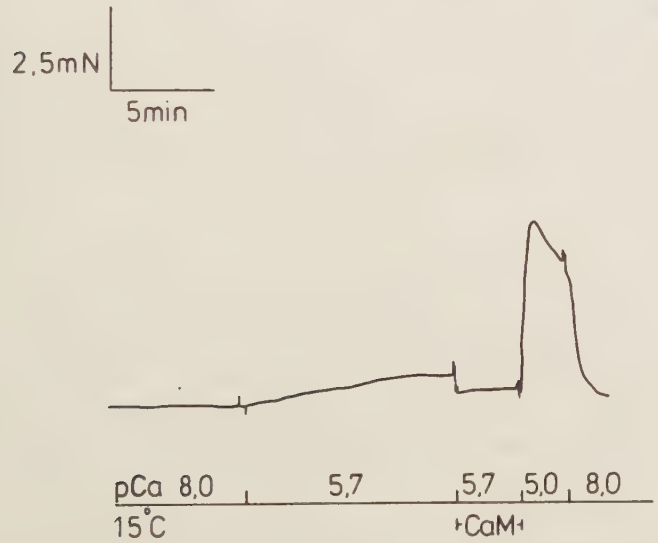


Abb. 13: Einfluß von Calmodulin (CaM; 5 umol·$l^{-1}$) in submaximaler $Ca^{2+}$-Konzentration auf die mechanische Antwort eines Längsfaserbündels von Sipunculus nudus

Aus Abb. 13 wird deutlich, daß die Zugabe von 5 umol·l$^{-1}$ CaM zum Inkubationsmedium bei den Präparaten aus der Longitudinalmuskulatur von Sipunculus nudus keine sofortige Änderung in der durch submaximale $Ca^{2+}$-Konzentration (pCa 5,7) induzierten Kraft bewirkte. Das traf auch für die Faserpräparate aus dem Retraktor zu. Auch eine längere Inkubation (bis zu 15 min) als die hier (3 min) gezeigte hatte keinen Einfluß. Eine Erhöhung der CaM-Konzentration von 5 auf 19 umol·l$^{-1}$ hatte keine Wirkung.

Im Gegensatz dazu führte beim Rattenuteruspräparat die Zugabe von 5 umol·l$^{-1}$ Calmodulin zum Inkubationsmedium zu einer fast maximalen Kontraktion (RT = 0,91; s. Abb. 14). Die Kraftentwicklung wurde bei pCa 6,3 mit CaM hier um das 2,3fache gesteigert. In anderen Präparaten ließ sich mit 2 uM oder 5 uM Calmodulin eine mehr als vierfache Erhöhung der Kraftentwicklung bei pCa 6,3 erzielen.

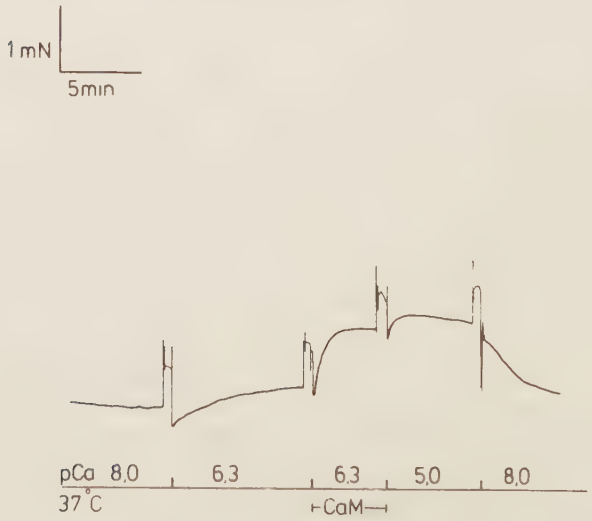


Abb. 14: Einfluß von Calmodulin (CaM; 5 umol·l$^{-1}$) in submaximaler $Ca^{2+}$-Konzentration auf die mechanische Antwort eines Rattenuterus-präparates

Ein auf die Kraftentwicklung eindeutig aktivierend einwirkendes Zielenzym des $Ca^{2+}$-CaM, wie die Myosinkinase des glatten Vertebratenmuskels, war durch Zugabe von CaM zur Faserpräparation bei den Fasern von Sipunculus nudus nicht nachzuweisen.

### 5.1.2 Der Einfluß von Phenothiazinderivaten auf die $Ca^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung

Ein anderer Nachweis für CaM-gesteuerte Prozesse ist die Hemmung CaM-abhängiger Reaktionen mit Phenothiazinderivaten. Phenothiazine sind Psychopharmaka, die reversibel an die aktive Form des Calmodulin binden. Die Bindung führt zu einer Dissoziation der $Ca^{2+}$-CaM-Enzymkomplexe. Die Enzyme werden dadurch inaktiviert.

In den Versuchen wurden die trizyklischen Phenothiazine Trifluoperazin (TFP) und Chlorpromazin (CPZ) eingesetzt. Ihre $Ca^{2+}$-abhängige Bindung ist sehr spezifisch und deshalb gut geeignet, $Ca^{2+}$-CaM-abhängige Vorgänge zu inhibieren und zu unterscheiden. Kerrick et al. (1980) zeigten an Faserbündeln aus dem glatten Vertebratenmuskel, daß sie zu einer Erschlaffung der kontrahierten Fasern und zu einer Abnahme des Phosphorylierungsgrades der leichten Ketten des Myosins führten.

Vorausgesetzt das Myosinkinase - Phosphatase-System war noch in den frisch gehäuteten und kurz glycerinbehandelten Fasern von Sipunculus nudus vorhanden, so müßte TFP oder Chlorpromazin auf die $Ca^{2+}$-CaM-abhängige Myosinkinase einwirken und wie bei der glatten Vertebratenmuskulatur eine Reduktion der $Ca^{2+}$-induzierten Kraftentwicklung bewirken (Cassidy et al., 1980; Kerrick et al., 1981).
Löste man in den gehäuteten Fasern von Längsmuskulatur oder Retraktor zunächst bei pCa 5,0 eine Kraftentwicklung aus und inkubierte anschließend unter den gleichen Bedingungen mit $10^{-4}$ mol· $l^{-1}$ TFP, blieb die $Ca^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung unbeeinflußt (s.Abb. 15, a).

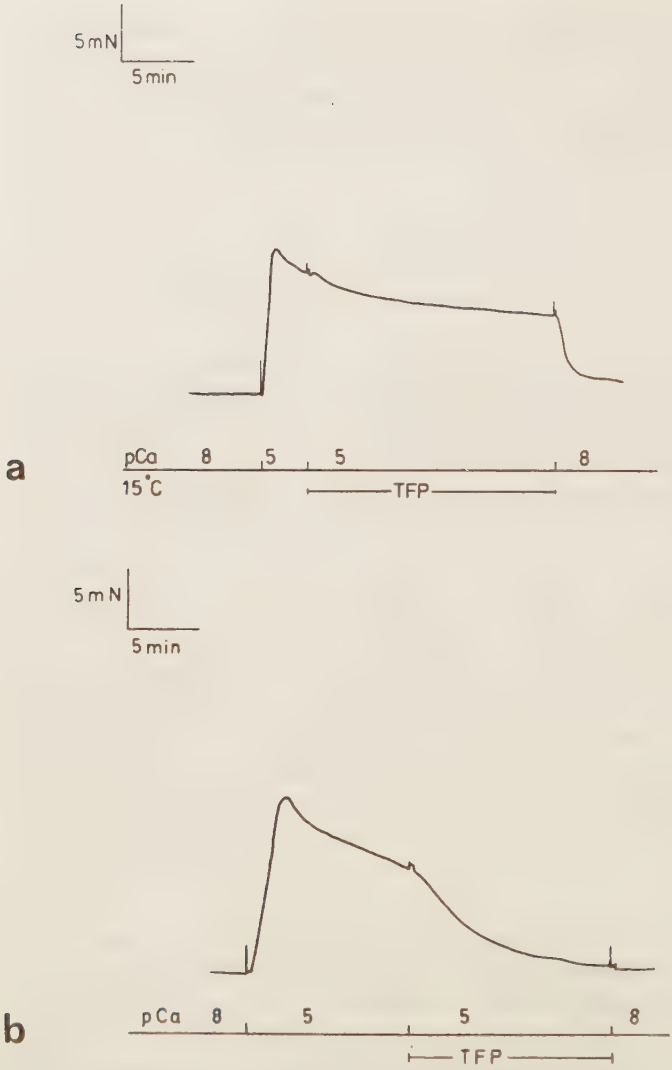


Abb. 15: Wirkung von $10^{-4}$ mol·l$^{-1}$ (a) und 3,3 x $10^{-4}$ mol·l$^{-1}$(b) Trifluoperazin (TFP) auf den $Ca^{2+}$-induzierten Kontraktionszustand der Längsfaserbündel

Wurde unter gleichen Voraussetzungen 3,3 x $10^{-4}$ mol·l$^{-1}$ TFP appliziert, erschlafften die Faserbündel aus der Längsmuskulatur beschleunigt (s. Abb. 15, b), z.T. so schnell

wie im $Ca^{2+}$-freien Puffer (s. Abb. 16). Die Dosis-Abhängigkeit wurde deutlicher als die Wirkung von weiteren verschiedenen TFP-Konzentrationen auf die $Ca^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung untersucht wurde. Die Kontraktionsexperimente wurden in gleicher Weise wie in Abb. 15 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

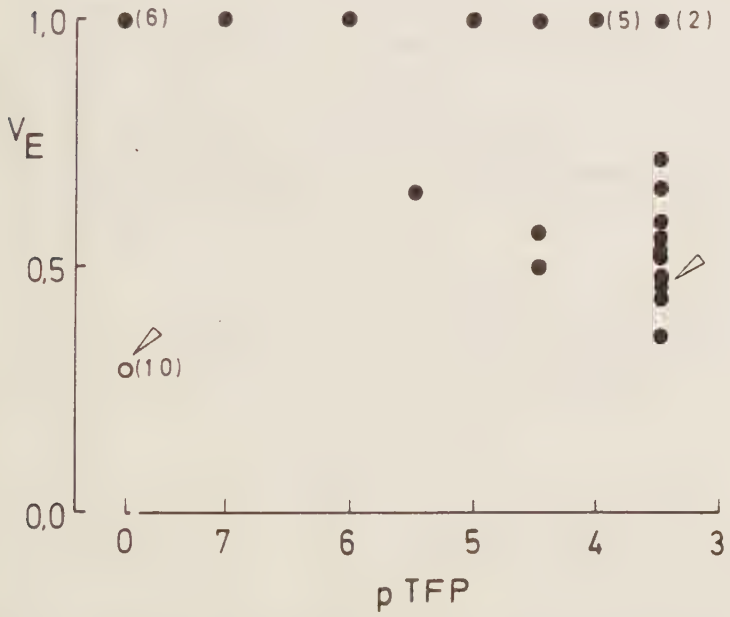


Abb. 16: Abhängigkeit des Verhältnisses von der Kraftabnahme bei pCa 5,0 zur Kraftabnahme bei pCa 5,0 + TFP ($V_E$) der maximal mit $Ca^{2+}$ kontrahierten Fasern von der TFP-Konzentration ( pTFP = - log [TFP]) - Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Die Pfeilspitzen deuten auf spezielle $V_E$ hin. Sie wurden aus dem Verhältnis der Kraftabnahme bei pCa 5,0 zur Kraftabnahme bei pCa 8,0 mit (geschlossener Kreis) und ohne TFP (offener Kreis) ermittelt.

Zur Quantifizierung wurde die Kraftabnahme der bei pCa 5,0 induzierten Kraftentwicklung zur anschließend registrierten Kraftabnahme bei pCa 5,0 mit TFP ins Verhältnis gesetzt. Die

Werte dieser Quotienten ($V_E$) wurden in Abb. 16 gegen den negativ dekadischen Logarithmus der TFP-Konzentration aufgetragen. Blieb die Kraftreduktion von TFP unbeeinflußt ergab sich ein Quotient von 1. Wirkte TFP erschlaffend (s. Abb. 15, b) wurde der Quotient kleiner 1.
Erst bei hohen TFP-Konzentrationen ($3{,}3 \times 10^{-4}$ mol·l$^{-1}$) konnte eine beschleunigte Erschlaffung der Faserbündel bzw. eine Inhibition der $Ca^{2+}$-induzierten Kraftentwicklung durch TFP in $Ca^{2+}$-Anwesenheit in mehreren Faserpräparaten erzielt werden. Bei geringeren TFP-Konzentrationen war die Inhibition nicht eindeutig.
Chlorpromazin blieb ebenso in einer Konzentration von $10^{-4}$ mol·l$^{-1}$ ohne sichtbar hemmende Wirkung auf die $Ca^{2+}$-induzierte Kraft (s. Abb. 17).

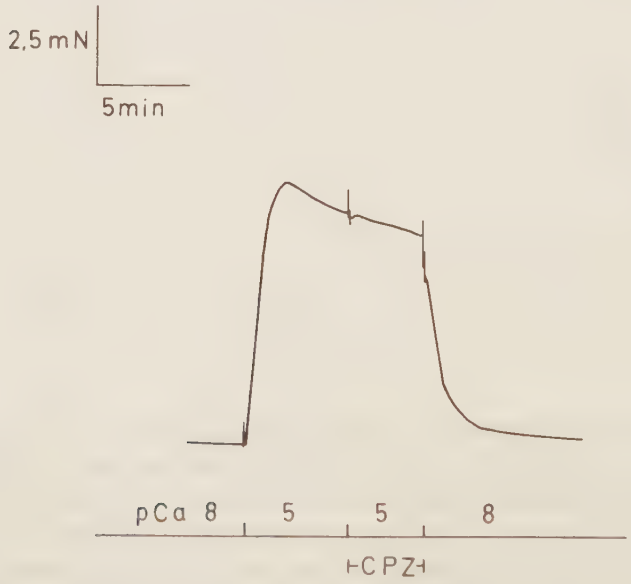


Abb. 17: Einfluß von $10^{-4}$ mol·l$^{-1}$ Chlorpromazin (CPZ) auf den $Ca^{2+}$-induzierten Kontraktionszustand eines gehäuteten Längsfaserbündels

Geht man davon aus, daß eine Myosinkinase noch in den Faserbündeln vorhanden war, läßt sich aus den Ergebnissen schließen, daß sie in der Regulation der Kraftentwicklung bei Sipunculus nudus keine Rolle spielt.

## 5.2 Einfluß verschiedener Substratanaloge (ITP; ATP$\gamma$S) auf die Kraftentwicklung, auf die ATPase-Aktivität und auf die $Ca^{2+}$-Sensitivität

### 5.2.1 Die Einflüsse von ITP

Ergänzend zu den dargelegten Experimenten zur Beteiligung einer CaM-abhängigen MLCK an der $Ca^{2+}$-Regulation der Kraftentwicklung kann die Nukleotidspezifität der Myosinkinase zur Charakterisierung und Unterscheidung von Regulationsmechanismen herangezogen werden. Mit ITP als Phosphatgruppendonator blieb bei den untersuchten Präparaten aus der glatten Muskulatur der Vertebraten eine Phosphorylierung und eine $Ca^{2+}$-abhängige Induktion der Kraftentwicklung aus (Watanabe, 1980; Cassidy & Kerrick, 1982).

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte mit ITP als Substrat dementsprechend an Uruspräparaten keine $Ca^{2+}$-abhängige Kraftentwicklung ausgelöst werden (s. Abb. 18).

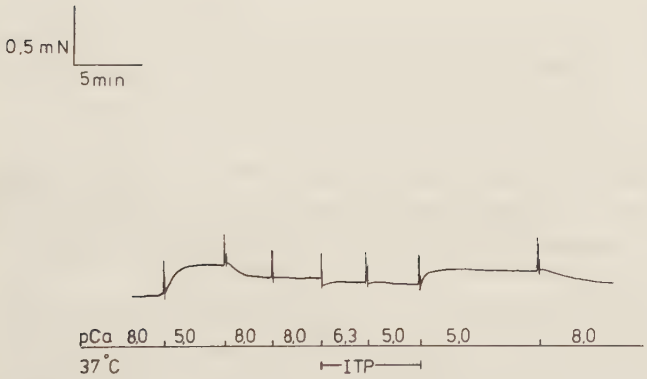


Abb. 18: Substitution von ATP durch ITP (5 $mmol \cdot l^{-1}$) - Originalaufzeichnung der Kraftentwicklung eines gehäuteten Uruspräparates - Die ITP-Substitution wurde in der Zeichnung angegeben.

Inkubierte man die Längsfaserbündel von Sipunculus nudus mit ITP statt mit ATP, kam es, im Gegensatz zu den Faserbündeln vom Rattenuterus, zu einer deutlich $Ca^{2+}$-abhängigen Kraftentwicklung (s. Abb. 19, a). Wurde der Myokinasehemmer $P^1,P^5$-Di(adenosin)5`- pentapnosphat ($Ap_5A$) mit einer Endkonzentration von $2 \times 10^{-4}$ mol $\cdot 1^{-1}$ zugesetzt, war die $Ca^{2+}$-Sensitivität von 100% auf 30% verringert (s. Abb. 19, b). Das heißt, mit ITP als Substituent und in Gegenwart von $Ap_5A$ kam es erst zu einer $Ca^{2+}$-unabhängigen Kontraktion, die dann durch Zugabe von $Ca^{2+}$ ($4,0 \times 10^{-6}$ mol$\cdot 1^{-1}$; pCa 5,4) noch gesteigert werden konnte. Die $Ca^{2+}$-unabhängige Kontraktion hatte eine andere Zeitkinetik als die $Ca^{2+}$-abhängige Kontraktion. Die Faserbündel entwickelten nur langsam eine stabile Kraft (s. Abb. 19, b)

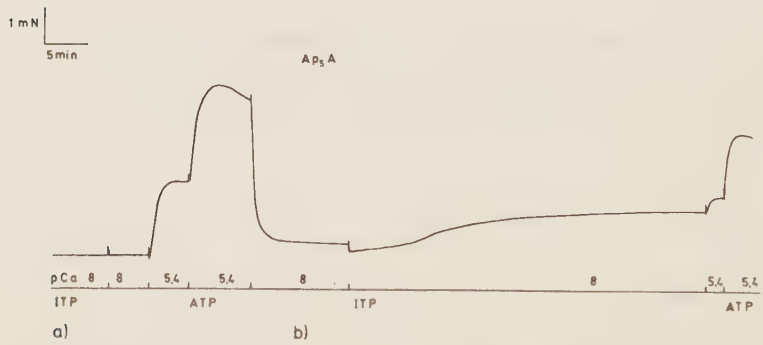


Abb. 19: Substitution von ATP durch ITP (5mmol$\cdot 1^{-1}$) - Originalaufzeichnung der Kraftentwicklung eines Längsfaserbündels - Der Beginn der Inkubationsfolge mit ITP, ATP und $Ap_5A$ (b) wurde indiziert.

Ein in $Ap_5A$-Anwesenheit mit ATP erschlafftes Faserbündel ist stärker erschlafft als ein mit ITP erschlafftes Faserbündel. ITP hat anscheinend bei gleicher molarer Konzentration eine geringere Weichmacherwirkung auf das Aktomyosinsystem von Sipunculus nudus als ATP. Das wurde auch in anderen Kontraktionsexperimenten deutlich. Durch $Ca^{2+}$ und ATP oder ITP kontrahierte Faserbündel erschlafften wesentlich schlechter mit ITP als mit ATP. Ohne $Ap_5A$ war hier die er-

schlaffende Wirkung der beiden Nukleotide gleich, d.h. die Grundspannung lag bei pCa 8,0 auf etwa gleichem Niveau.

Die Amplitude der $Ca^{2+}$-abhängigen Kraftentwicklung mit ITP (5 $mmol \cdot l^{-1}$) war unter gleichen Bedingungen stets geringer als mit ATP (5 $mmol \cdot l^{-1}$). Sie betrug in dem gezeigten Kontraktionsprotokoll 46% bzw. 50% (s. Abb. 19, a bzw. b) der anschließend mit ATP erreichten Spannungsentwicklung. Sie konnte bei dieser Nukleotidkonzentration bis zu 70% betragen und lag im Mittel bei 58 $\pm$ 8% (n = 6).

Da die Faserbündel zunächst zu Beginn der Inkubationsfolge mit 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP erschlafft wurden, mußte überprüft werden, ob die Fasern aufgrund von verbliebenem ATP in den Bündeln kontrahierten. Zur Entfernung des internen ATP wurden die Fasern in Rigor-Lösung mit Hexokinase (20 $U \cdot ml^{-1}$) und Glucose (10 $mmol \cdot l^{-1}$) (Gagelmann et al., 1984) präinkubiert und anschließend in Rigor-Lösung gespült. Auch nach dieser Vorbehandlung kontrahierten die Faserbündel mit ITP. Eine eindeutig $Ca^{2+}$-abhängige Kraftentwicklung war nachweisbar. Die Faserbündel vom Retraktor kontrahierten mit ITP ebenfalls $Ca^{2+}$-abhängig.

In Vorversuchen hatte sich angedeutet, daß die ITP-Konzentration einen Einfluß auf die $Ca^{2+}$-Sensitivität der Längsfaserbündel hat. Die in Abb. 19 a und b dargestellte Inkubationsfolge wurde deshalb für verschiedene ITP-Konzentrationen registriert. In Abb. 20 wurde die relative Kraftentwicklung der Faserbündel ohne $Ap_5A$ gegen den negativ dekadischen Logarithmus der ITP-Konzentration aufgetragen. In Abb. 21 wurde die in der Folge erhaltene relative Kraftentwicklung mit $Ap_5A$ in den Ansätzen in gleicher Weise aufgetragen (Dreiecke).
Die $Ca^{2+}$-abhängige Kraftentwicklung der Längsfaserbündel mit ITP war bei verschiedenen ITP-Konzentrationen relativ zur folgenden Kraftentwicklung mit 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP bei pCa 5,4 mit und ohne $Ap_5A$ etwa gleich hoch. Die $Ca^{2+}$-unabhängige Kraftentwicklung blieb ohne $Ap_5A$ bei allen ITP-Konzentrationen unter 2% relativer Kraftentwicklung (s. Abb. 20), nahm mit $Ap_5A$ jedoch bis auf 34% bei 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ITP zu (s. Abb. 21).

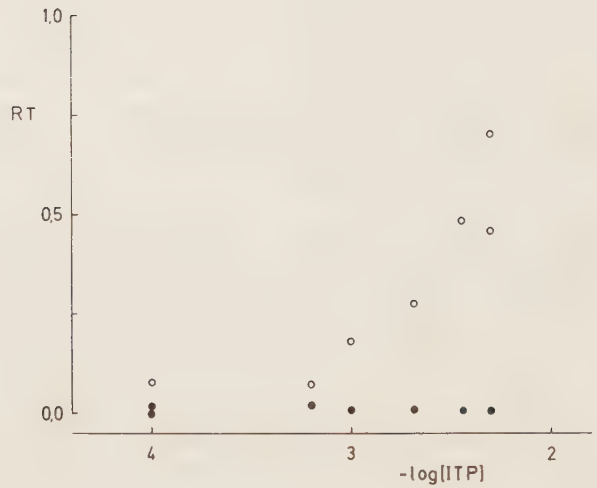


Abb. 20: Abhängigkeit der relativen Kraftentwicklung von verschiedenen ITP-Konzentrationen ohne Zusatz von $Ap_5A$
Offene Kreise: pCa 5,4; geschlossene Kreise : pCa 8,0
In der Relation wurde die bei pCa 5,4 und mit 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP induzierte Kraft gleich 1 gesetzt.

Bei höheren ITP-Konzentrationen waren die Präparate weniger $Ca^{2+}$-sensitiv. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität der Faserbündel nahm von 62% auf 31% ab. War kein $Ap_5A$ in den Medien lag sie bei allen ITP-Konzentrationen über 95% (s. Abb. 22).

In einer anderen Versuchsserie wurde das mechanische Verhalten der Faserbündel sofort unter den in Abb. 19 b gezeigten Bedingungen studiert. Es war zwar eine abnehmende Tendenz der $Ca^{2+}$-Sensitivität der Kraftentwicklung mit zunehmender ITP Konzentration erkennbar, die Werte schwankten aber stark (s. Abb. 22, offene Dreiecke).

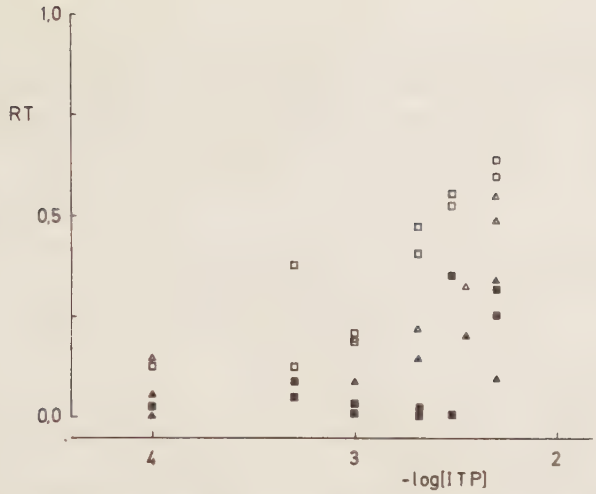


Abb. 21: Abhängigkeit der relativen Kraftentwicklung von verschiedenen ITP-Konzentrationen (0,1 - 5 mmol·l$^{-1}$)
Offene Symbole: pCa 5,4; geschlossene Symbole: pCa 8,0
Allen Ansätzen war 2 x $10^{-4}$ mol·l$^{-1}$ $Ap_5A$ zugesetzt.
In der Relation wurden die bei pCa 5,4 und mit 5 mmol·l$^{-1}$ ATP induzierte Kraft gleich 1 gesetzt.

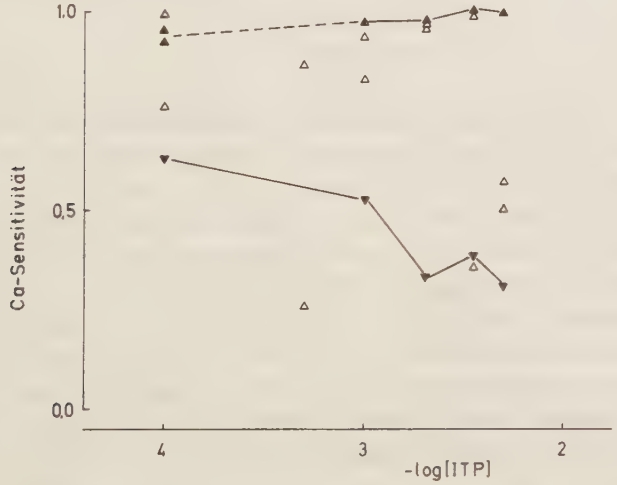


Abb. 22: Abhängigkeit der $Ca^{2+}$-Sensitivität der Faserpräparate von der ITP-Konzentration
▲ ohne $Ap_5A$; ▼△mit $Ap_5A$;
1 , 100 % Hemmung in $Ca^{2+}$Abwesenheit (pCa 8,0)

Bei verschiedenen ATP-Konzentrationen ($10^{-4}$ bis 5 x $10^{-3}$ $mol \cdot l^{-1}$) blieb dagegen die $Ca^{2+}$-Sensitivität der Kraftentwicklung der Längsfaserbündel von den gleichen Nukleotidkonzentrationen unbeeinflußt (s. Abb. 23).

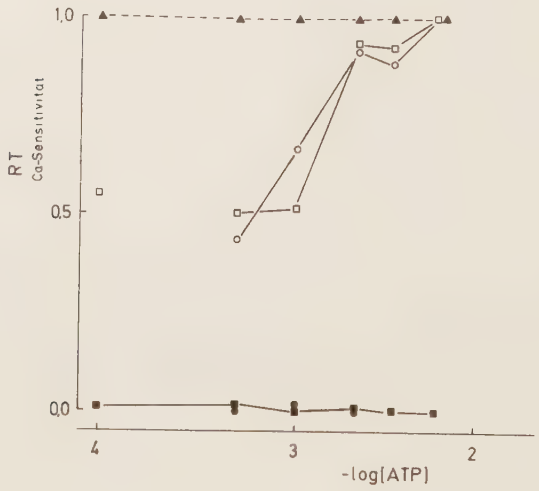


Abb. 23: Abhängigkeit der relativen Kraftentwicklung und der $Ca^{2+}$-Sensitivität von verschiedenen ATP-Konzentrationen (0,1 - 5 $mmol \cdot l^{-1}$)
offene Symbole, Kreise oder Vierecke : pCa 5,4
geschlossene Symbole, Kreise oder Vierecke: pCa 8,0
Kreise : mit $Ap_5A$ (2 x $10^{-4}$ $mol \cdot l^{-1}$)
Vierecke : ohne $Ap_5A$
geschlossene Dreiecke : $Ca^{2+}$-Sensitivität mit und ohne $Ap_5A$
In der Relation wurde die bei pCa 5,4 und mit 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP induzierte Kraft gleich 1 gesetzt. 1 entspricht ebenfalls 100 % Hemmung in $Ca^{2+}$-Abwesenheit.

Die $Ca^{2+}$-Sensitivität lag bei allen Konzentrationen bei über 98%. Die $Ca^{2+}$-unabhängige bzw. $Ca^{2+}$-abhängige relative Kraftentwicklung war fast gleich und unabhängig davon, ob der Myokinasenemmer hinzugegeben wurde oder nicht.

Für das natürliche Aktomyosin von Sipunculus nudus konnte eine $Ca^{2+}$-abhängige ITPase-Aktivität gezeigt werden. Die Sensitivität der Aktomyosin-ATPase gegenüber $Ca^{2+}$ war mit ITP als Substrat geringer (72%) als mit ATP (94%). Die $Ca^{2+}$-abhängige Enzymaktivität mit ITP war ebenfalls geringer. Die ITPase-Aktivität des Aktomyosins betrug nur 13% der ATPase-Aktivität (35 nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$ bzw. 267 nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$). Ursache ist wahrscheinlich eine geringere Affinität des ITP zum nativen Aktomyosin.

Isoliertes Myosin von Sipunculus nudus, hybridisiert mit unreguliertem Aktin, wies dagegen nur einen geringen Unterschied in der $Ca^{2+}$-Sensitivität der Akto-Myosin-ATPase-Aktivität bei der Nukleotidsubstitution auf. War ATP Substrat, reagierte das Akto-Myosin zu 97% $Ca^{2+}$-sensitiv; bei der Substitution durch ITP betrug die $Ca^{2+}$-Sensitivität 91%. Die Aktivität bei pCa 4,0 mit ITP machte 65% der Aktivität mit ATP aus (141 nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$ bzw. 216 nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$). Die Affinität der Myosin-ATPase zum ITP in dem Hybrid scheint erhöht, denn bei gleicher Substratkonzentration ist die relative Hydrolyserate gegenüber derjenigen des natürlichen Aktomyosins gesteigert. Das regulierte Aktin hat möglicherweise über einen allosterischen Mechanismus einen inhibitorischen Effekt auf die Enzymaktivität.

In der Abhängigkeit der relativen Kraftentwicklung von der freien $Ca^{2+}$-Konzentration in Anwesenheit von $Ap_5A$ mit 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP oder ITP ergab sich ein wesentlicher Unterschied (s. Abb. 24). War ATP Substrat, erhielt man eine ausgeprägte sigmoide Dosis-Wirkungskurve mit hoher positiver Kooperativität ($n_{50}$ = 5,86) in der mechanischen Antwort. Die $Ca^{2+}$-Konzentration für die halbmaximale Kraftinduktion betrug $1,8 \times 10^{-6}$ $mol \cdot l^{-1}$ (pCa = 5,75). Mit ITP als Substrat wurde bei einem pCa von 6,6 bereits eine Kraftentwicklung von 43% erhalten. Die Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration bis zu einem pCa von 5,4 veränderte die Kraftentwicklung nur gering, und sie erreichte nur 62% der mit 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP bei pCa 5,4 maximal induzierten Kraft.

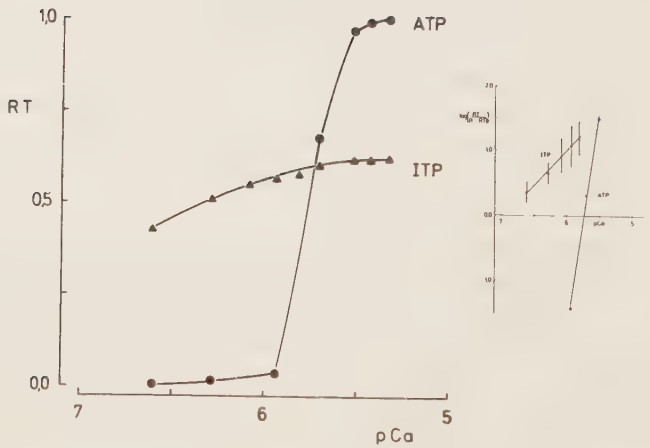


Abb. 24: Zusammenhang zwischen freier $Ca^{2+}$-Konzentration und relativer Kraftentwicklung der Längsfaserbündel mit 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP und 5 $mmol \cdot l^{-1}$ ITP in Anwesenheit von $Ap_5A$ (2 x $10^{-4}$ $mol \cdot l^{-1}$)
Rechts: Hill-Diagramm der Dosis-Wirkungskurven

Die beteiligten Interaktionsstellen wirkten in ITP-Gegenwart nicht kooperativ, das äußerte sich in einem Hill-Koeffizienten von 1. Im micromolaren $Ca^{2+}$-Konzentrationsbereich war die $Ca^{2+}$-Kontrolle der Kraftentwicklung in Gegenwart von ITP stark beeinträchtigt. Die Kooperativität in der Kraftentwicklung ist vom Nukleotid beeinflußbar.

### 5.2.2 Effekte von ATP$\gamma$S

Im Gegensatz zu ITP ist das ATP-Analogon ATP$\gamma$S Substrat der $Ca^{2+}$-CaM-abhängigen Myosinkinase. Die Thiophosphorylierung der leichten Ketten mit ATP$\gamma$S ist nahezu irreversibel, weil die Thiophosphatgruppen durch die Myosinphosphatase kaum abgespalten werden. Im glatten Vertebratenmuskel ist nach Inkubation mit ATP$\gamma$S in $Ca^{2+}$-Gegenwart die Aktomyosin-ATPase-

Aktivität (Sherry et al., 1978; Cassidy & Kerrick, 1982 ) und die Kraftentwicklung (Hoar et al., 1979; Cassidy et al., 1979; Sparrow et al., 1981) von der $Ca^{2+}$-Konzentration unabhängig.

Hierzu wurde zunächst der experimentelle Ablauf und die Wirkung des ATPγS am gehäuteten Rattenuterispräparat getestet. Die Abb. 25 gibt die Originalaufzeichnung der Kraftentwicklung wieder. Es ist deutlich zu erkennen, daß nach Inkubation des Präparates in 2 $mmol \cdot l^{-1}$ ATPγS in Erschlaffungs- und Kontraktionspuffer das Faserbündel $Ca^{2+}$-unabhängig, fast maximal (RT = 0,98) kontrahierte. Die Kontraktion ließ sich durch Erschlaffungspuffer nicht wieder lösen. Erst mit 2 $mmol \cdot l^{-1}$ AMP-PCP, einem unhydrolysierbaren erschlaffend wirkenden ATP-Analogon, nahm die Kraftentwicklung ab. Das Faserbündel entwickelte erneut annähernd maximale Kraft (RT = 0,95) als ATP zugesetzt wurde. Diese Kraftentwicklung war wiederum $Ca^{2+}$-unabhängig. Es konnte so gezeigt werden, daß die $Ca^{2+}$-unabhängige Kontraktion auf der Interaktion von persistent unreguliertem Aktomyosin beruhte.

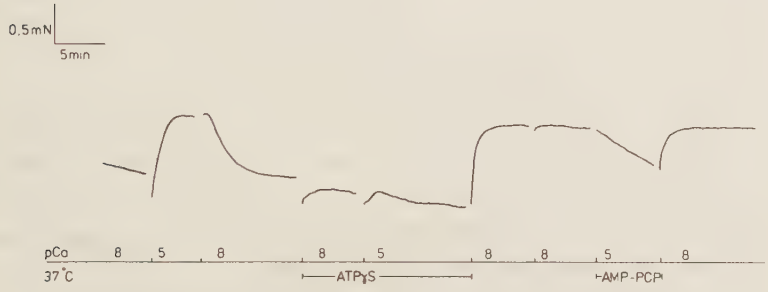


Abb. 25: Isometrische Kraftentwicklung eines gehäuteten Faserbündels vom Rattenuterus vor, während und folgend der Inkubation in ATPγS (2 $mmol \cdot l^{-1}$). Beachte die Reduktion der $Ca^{2+}$-insensitiven Kontraktion mit AMP-PCP (2 $mmol \cdot l^{-1}$).

Nach der Inkubation mit 2 $mmol \cdot l^{-1}$ ATPγS in Erschlaffungs- und Kontraktionspuffer kontrahierten die Faserbündel von

Sipunculus nudus wie beim Rattenuterus $Ca^{2+}$-unabhängig (s. Abb. 26, a). Diese Kraftentwicklung war im Gegensatz zu der im Präparat vom Rattenuterus submaximal (RT = 0,13 ± 0,04) und transitorisch. Meist innerhalb von 5 min, längstens aber nach 20 min waren die Faserbündel wieder erschlafft. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität der Kontraktilität blieb erhalten. Mit $Ca^{2+}$ ließ sich anschließend eine im Vergleich zur transitorischen Kraftentwicklung fast immer doppelt so hohe Kontraktion auslösen, die im Erschlaffungspuffer wieder auf das Ausgangsniveau zurückging. Für die Faserbündel vom Retraktor von Sipunculus nudus wurde in diesen Experimenten eine gleiche mechanische Antwort gefunden.

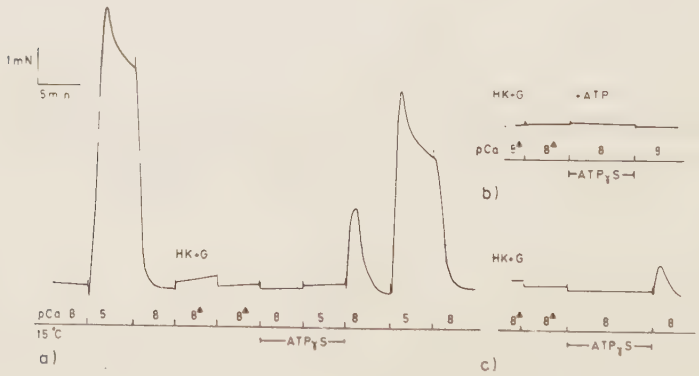


Abb. 26: Isometrische Kraftentwicklung der gehäuteten Faserbündel aus der Längsmuskulatur von Sipunculus nudus

a) Präinkubiert mit $ATP\gamma S$ (2 $mmol \cdot l^{-1}$) in $Ca^{2+}$-Ab- und Anwesenheit

b) Präinkubiert mit äquimolaren Konzentrationen (2 $mmol \cdot l^{-1}$) $ATP\gamma S$ und ATP in $Ca^{2+}$-Abwesenheit

c) Präinkubiert mit $ATP\gamma S$ (2 $mmol \cdot l^{-1}$) in $Ca^{2+}$-Abwesenheit

HK , Hexokinase (20 $U \cdot ml^{-1}$) ; G , Glucose (10 $mmol \cdot l^{-1}$)

pCa 8,0 markiert mit Dreieck : Rigor-Lösung

Alle sonstigen, nicht mit $ATP\gamma S$ gekennzeichneten Lösungen enthalten 2 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP.

Die transitorische Spannungsentwicklung war auch nach 30minütiger Inkubation mit ATPγS in Erschlaffungspuffer zu beobachten (s. Abb. 26, c; nach 10 min). Der zugrunde liegende Mechanismus scheint deshalb $Ca^{2+}$-unabhängig zu sein.

Die transitorische Kraftentwicklung trat in allen Experimenten nach der Inkubation mit ATPγS aber nur in Gegenwart von ATP auf. Sie unterblieb, wenn ITP als Substrat angeboten wurde oder wenn kein Substrat zugegen war (Rigor-Lösung) und war nach 5minütiger Zwischeninkubation in Rigor-Lösung bei der Zugabe von ATP nicht mehr registrierbar. Die transitorische $Ca^{2+}$-unabhängige Kraftentwicklung mit ATP unterblieb ebenfalls, wenn die Präparate in 2 $mmol \cdot l^{-1}$ ATPγS und in 2 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP gleichzeitig präinkubiert wurden (s. Abb. 26, b). Sie war an einem Präparat mehrfach, jeweils nach Vorinkubation mit ATPγS, auszulösen.

Die nach Präinkubation mit ATPγS induzierte Kraftentwicklung war reversibel. Sie trat auch auf, wenn mit ATPγS ohne $Ca^{2+}$ präinkubiert wurde. Daraus wurde geschlossen, daß eine CaM-gesteuerte Reaktion, die zu einer phosphataseresistenten Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten führt, nicht maßgebend an der Regulation der Kontraktion beteiligt ist.

## 6. Charakterisierung des Myosins - Versuche zur myosingekoppelten Regulation und zum direkten Nachweis der $Ca^{2+}$-Bindung an das Myosin als potentiellem Regulationsmechanismus

### 6.1 SDS-PAGGE des Myosins

In Abb. 27 ist die Auftrennung des Myosins aus Längs- und Ringmuskulatur von Sipunculus nudus in der SDS-PAGGE dargestellt. Zu erkennen ist, daß sich die Myosine von der Ring- und Längsmuskulatur in der Anzahl der leichten Ketten unterscheiden. Das Myosin aus der Längsmuskulatur (s. Abb. 27, a) enthält zwei ($LC_1$ und $LC_2$) und das Myosin aus der Ringmuskulatur (s. Abb. 27, b) drei ($LC_1$, $LC_2$ und $LC_3$) leichte

Ketten. Sie wurden in der Reihenfolge geringer werdender relativer Molekülmasse numeriert. Die Auftrennung der $LC_1$ und $LC_2$ des Myosins aus der Längsmuskulatur sowie der $LC_2$ und $LC_3$ des Myosins aus der Ringmuskulatur war schwierig und nicht immer erfolgreich, da sie sich bei einer relativen Molekülmasse von 17.000 nur um ungefähr 300-400 in der relativen Molekülmasse unterscheiden. Die $LC_1$ des Myosins aus der Ringmuskulatur hatte eine relative Molekülmasse von ca. 18 200. Die Massen wurden mittels der SDS-PAGGE bestimmt.

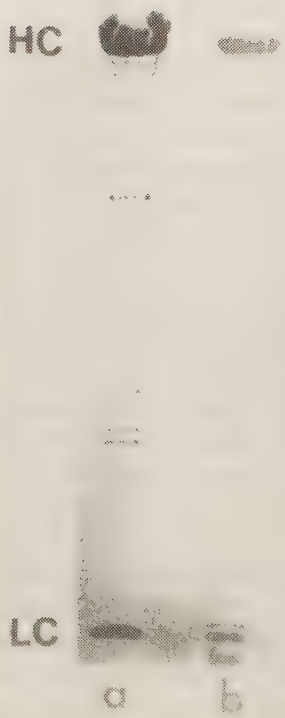


Abb. 27: Auftrennung des Myosins aus Längs- und Ringmuskulatur mittels der SDS-PAGGE
a) Myosin der Längsmuskulatur
b) Myosin der Ringmuskulatur
HC, Schwere Myosinkette; LC, Leichte Myosinketten

## 6.2 Abhängigkeit der $Ca^{2+}$-Myosin-ATPase-Aktivität von der freien $Ca^{2+}$-Konzentration

Betrachtet man zunächst den Einfluß der freien $Ca^{2+}$-Konzentration auf die relative ATPase-Aktivität der $Ca^{2+}$-abhängigen Myosin-ATPase, so zeigt sich, daß die $Ca^{2+}$-Ionen im micromolaren Bereich gleichbleibend aktivierten (s. Abb. 28).

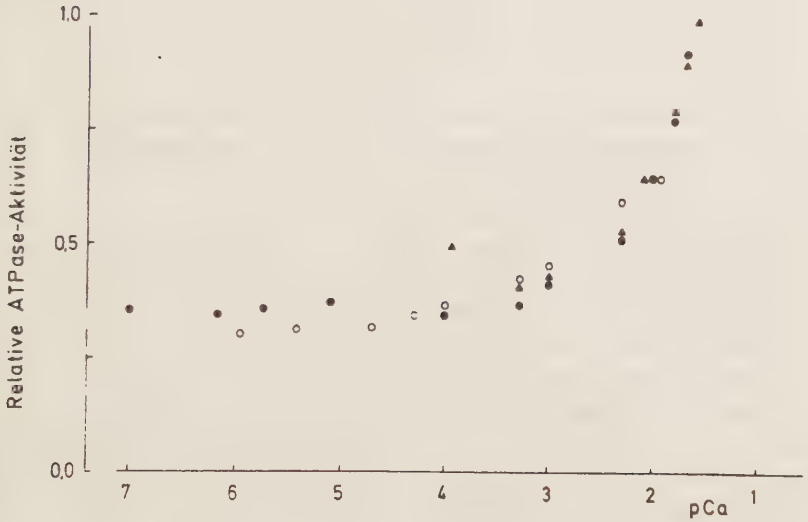


Abb. 28: Die Myosin-ATPase-Aktivität als Funktion der freien $Ca^{2+}$-Konzentration (0,6 mg Myosin·$ml^{-1}$ Ansatz)
geschlossene Symbole : Myosin aus dem gesamten HMS; Inkubation in 20 mmol·$l^{-1}$ Tris-Maleat pH 7,0, 20 mmol·$l^{-1}$ KCl, 1 mmol·$l^{-1}$ ATP; Kreise und Dreiecke kennzeichnen verschiedene Präparationen
offene Symbole : Myosin aus der Längsmuskulatur; Inkubation in 50 mmol·$l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 7,0, 50 mmol·$l^{-1}$ KCl, 1 mmol·$l^{-1}$ ATP

Die Aktivität des Myosins aus der Längsmuskulatur betrug bei $10^{-4}$ mol·l$^{-1}$ $Ca^{2+}$ 165 nmol $P_i$·mg Prot.$^{-1}$·min$^{-1}$. Erst unphysiologisch hohe $Ca^{2+}$-Konzentrationen im millimolaren Bereich bewirkten eine wesentliche Steigerung der ATPase-Aktivität des Myosins. Letzteres traf auch für die $Ca^{2+}$-abhängige Myosin-ATPase des Myosins vom Kaninchen-Skelettmuskel zu. Bei den verschiedenen $Ca^{2+}$-Konzentrationen zwischen $10^{-7}$ mol·l$^{-1}$ und $10^{-4}$ mol·l$^{-1}$ hatte es eine ATPase-Aktivität von im Mittel 10 nmol $P_i$·mg Prot.$^{-1}$·min$^{-1}$. Im micromolaren Konzentrationsbereich war die ATPase-Aktivität also deutlich geringer als beim Myosin von Sipunculus.

## 6.3 Zusammenhang zwischen freier $Ca^{2+}$-Konzentration und aktinaktivierter $Mg^{2+}$-abhängiger Myosin-ATPase-Aktivität

Wurde Myosin aus der Längsmuskulatur von Sipunculus nudus mit unreguliertem Aktin vom Kaninchen-Skelettmuskel hybridisiert, erfolgte die Induktion der maximalen Akto-Myosin-ATPase-Aktivität bei $10^{-4}$ mol·l$^{-1}$ $Ca^{2+}$. Die ATP-Hydrolyse war bei $Ca^{2+}$-Konzentrationen unter 2,5 x $10^{-7}$mol·l$^{-1}$ (pCa > 6,6) zu mehr als 90% gehemmt. Eine gut vierhundertfache Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration war also notwendig, um eine maximale Hydrolyserate zu erhalten. In Abb. 29 wurde die relative ATPase-Aktivität gegen den negativ dekadischen Logarithmus der $Ca^{2+}$-Konzentration aufgetragen. In der Hill-Diagramm-Analyse ergab sich ein $pCa_{50}$ von 5,4 und ein $n_{50}$ von 0,9.

Im Vergleich zum Myosin des Skelettmuskels (s. Abb. 29) hatte das aktinaktivierte Myosin von Sipunculus nudus im physiologischen $Ca^{2+}$-Konzentrationsbereich jedoch eine höhere Empfindlichkeit gegenüber $Ca^{2+}$. Die gleichen Änderungen hatten auf die Akto-Myosin-ATPase-Aktivität der Rekombination aus Myosin und unreguliertem Aktin aus dem Skelettmuskel nur wenig Einfluß. Bei pCa 4,0 erreichte es maximale Aktivität. Bei pCa 6,6 war dieses Akto-Myosin bereits zu 75% aktiv, während das Hybrid mit Sipunculus-Myosin bei dieser $Ca^{2+}$-Konzentration noch stark gehemmt war.

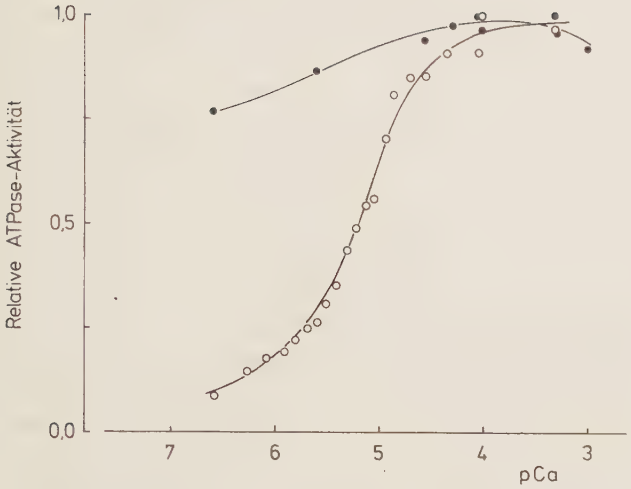


Abb. 29: Die aktinaktivierte $Mg^{2+}$-abhängige Myosin-ATPase-Aktivität als Funktion der freien $Ca^{2+}$-Konzentration.
offene Kreise: Myosin aus der Längsmuskulatur von Sipunculus nudus (0,3 mg·ml$^{-1}$) - geschlossene Kreise: Myosin aus dem Kaninchenskelettmuskel (0,3 mg·ml$^{-1}$)
Aktin vom Kaninchenskelettmuskel (in beiden Ansätzen 0,6 mg·ml$^{-1}$); Inkubationsmedien: 50 mmol·l$^{-1}$ Imidazol-HCl pH 6,8, 50 mmol·l$^{-1}$ KCl, 4 mmol·l$^{-1}$ $MgCl_2$, 1mmol·l$^{-1}$ ATP

## 6.4 Bindung von $Ca^{2+}$ an Myosin

Neben der gezeigten Sensitivität der aktinaktivierten Myosin-ATPase gegenüber $Ca^{2+}$ ist eine spezifische $Ca^{2+}$-Bindung an das Myosin ein wichtiges Kriterium für die Lokalisation der $Ca^{2+}$-Kontrolle am Myosin. Deshalb wurde im weiteren mit $^{45}Ca$ untersucht, ob isoliertes Myosin $Ca^{2+}$ mit hoher Affinität bindet und dadurch eine Bedeutung für die $Ca^{2+}$-abhängige Regulation haben könnte, wie es beim Molluskenmuskel der Fall ist (Szent-Györgyi et al., 1973).

Die $Ca^{2+}$-Bindungseigenschaften der Myosine aus Längs- und Ringmuskulatur von Sipunculus nudus wurden mit denen vom Myosin des Vertebratenskelettmuskels verglichen, da das Myosin der quergestreiften Muskeln keine spezifischen hochaffinen $Ca^{2+}$-Bindungsstellen besitzt (Bagshaw & Kendrick-Jones, 1979).

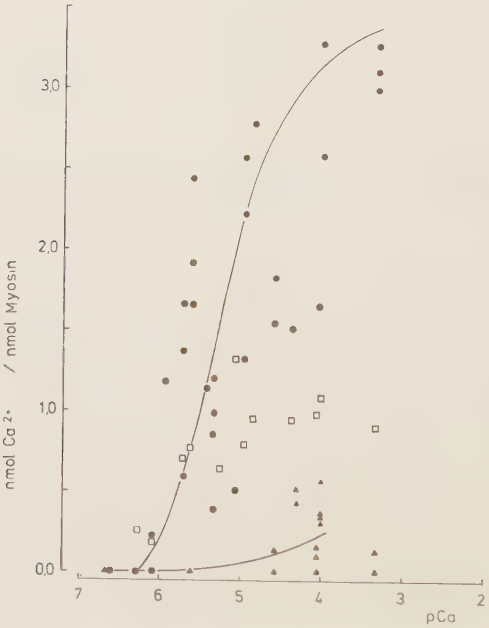


Abb. 30: $Ca^{2+}$-Bindung an Myosin - Die Bestimmung erfolgte mittels einer Gleichgewichtsdialyse mit $^{45}Ca$. Gebundenes $Ca^{2+}$ in nmol $Ca^{2+}$/nmol Myosin wurde gegen die freie $Ca^{2+}$-Konzentration aufgetragen.
Kreise: Myosin aus der Längsmuskulatur von Sipunculus nudus - Dreiecke : Myosin vom Kaninchenskelettmuskel - Vierecke : Myosin aus der Ringmuskulatur - Inkubationsmedien: 50 $mmol \cdot l^{-1}$ Imidazol-HCl pH 6,8, 50 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl, 4 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$, 10, 20 bzw. 25 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaPP_i$.

Wie aus Abb. 30 hervorgeht liegen die $Ca^{2+}$-Bindungskurven der Myosine aus dem HMS von Sipunculus im Bereich höherer pCa-Werte als die vom Myosin aus dem Skelettmuskel des Kaninchens, das heißt, die Myosine von Sipunculus nudus hatten eine viel höhere Affinität zum $Ca^{2+}$ als das Myosin vom Skelettmuskel. Die Änderung der Bindung von $Ca^{2+}$ an die Myosine von Sipunculus nudus erfolgte in dem gleichen $Ca^{2+}$-Konzentrationsbereich, in dem auch die Akto-Myosin-ATPase-Aktivität zunahm.
Der $pCa_{50}$ für die $Ca^{2+}$-Bindung lag bei etwa 5,0 für das Myosin aus der Längsmuskulatur und bei etwa 5,7 für das Myosin aus der Ringmuskulatur. Der $n_{50}$ war kleiner 1.
Bei pCa 5,0, bei dem maximale Kraftentwicklung in den Längsfaserbündeln induziert wird, hatte das Myosin aus der Längsmuskulatur etwa 2 mol $Ca^{2+}$/ mol Myosin gebunden.
Bei pCa 4,0 hatte das Myosin vom Skelettmuskel noch weniger als 1 mol $Ca^{2+}$/ mol Myosin gebunden, während das Myosin aus der Längsmuskulatur bei dieser $Ca^{2+}$-Konzentration mehr als 2 mol $Ca^{2+}$/ mol Myosin gebunden hatte. Das Myosin aus der Ringmuskulatur hatte etwa nur 1 mol $Ca^{2+}$/ mol gebunden.

## 7. Pyrophosphatgelelektrophorese

Um in den Faserpräparaten Modifikationen am Myosin, bedingt durch Kontraktion und Erschlaffung oder durch dissoziierende Agenzien feststellen zu können, wurde die Möglichkeit der Isolierung von Myosin durch die Extraktion mit $Na^{+}$-Pyrophosphat mit anschließender kontinuierlicher Pyrophosphatgelelektrophorese im PAG geprüft (s. II. 13).

In Abb. 31 ist der Pyrophosphatextrakt aus gehäuteten Fasern im SDS-PAGGE aufgetrennt. Er enthielt in große Mengen Paramyosin und Aktin. Innerhalb von 3,5 h ließen sich in der Pyrophophatgelelektrophorese Myosin, Paramyosin und Aktin mit den assoziierten Proteinen trennen. Die Zuordnung erfolgte durch gelelektrophoretische Analyse des Pyrophosphatgels in der SDS-PAGGE in der zweiten Dimension. Zu erkennen war, daß die im Pyrophosphatgel am weitesten gewanderte Bande den

dünnen Filamenten mit den assoziierten Proteinen, wie Tropomyosin und Troponin, entsprach. Die mittlere Bande entsprach dem Paramyosin, und die am wenigsten weit gewanderte Bande entsprach dem Myosin aus schweren und leichten Ketten.

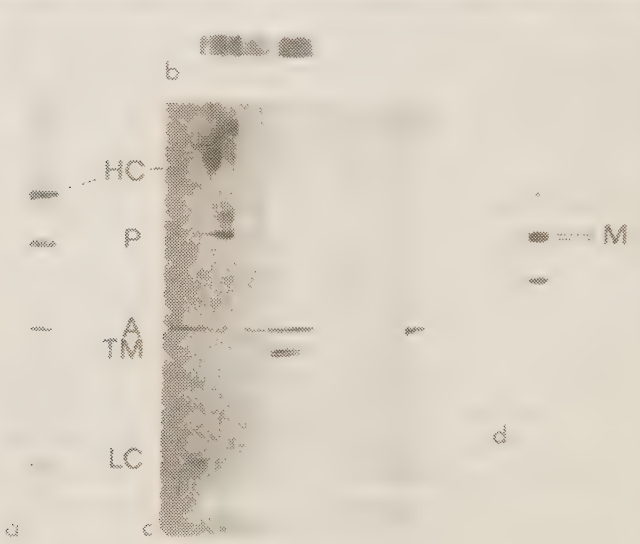


Abb. 31: Auftrennung des Pyrophosphatextraktes aus gehäuteten Längsfaserbündeln in der SDS-PAGGE und im Pyrophosphatgel
a) SDS-PAGGE des Pyrophosphatextraktes
b) Pyrophosphatextrakt im Pyrophosphatgel (Trenndauer, 3,5h)
c) Zweidimensionale Trennung des Extraktes; erste Dimension s. b); zweite Dimension : SDS-PAGGE
d) Pyrophosphatextrakt im Pyrophosphatgel (Trenndauer, 15 h)
HC, schwere Ketten des Myosins; P, Paramyosin; A, Aktin; TM, Tropomyosin; LC, leichte Ketten des Myosins; M, Myosin

Wurde die Gelelektrophoresedauer in der Pyrophosphatgelelektrophorese auf 15 Stunden ausgedehnt, erhielt man eine weitere Auftrennung der Myosinbande in zwei Banden. Es wurde vermutet, daß es sich um zwei Myosin-Isoformen der longitudinalen Muskulatur handelte. Die Bande der dünnen Filamente war bereits aus den Gelen gewandert.

## 8. Desensibilisierungs- und Resensibilisierungsexperimente

Die regulatorischen Proteine wie z.B. TnC und die leichten Ketten sind die Sensibilisatoren des Aktomyosinsystems für $Ca^{2+}$-Ionen. Werden sie aus dem System entfernt, ist das System desensibilisiert oder unreguliert und benötigt für die Interaktion zwischen Aktin und Myosin kein freies $Ca^{2+}$ mehr, da die aktinaktivierte Myosin-ATPase-Aktivität selbst $Ca^{2+}$-unabhängig ist. Verleiht umgekehrt ein hinzugegebenes Regulatorprotein einer solchen desensibilisierten Präparation wieder $Ca^{2+}$-Sensitivität in der Aktivität, so ist das System resensibilisiert.

Wurden Myosin, Aktomyosin oder die gehäuteten Fasern von Sipunculus mit EDTA (10 $mmol \cdot l^{-1}$) behandelt, so wurde eine Abnahme der $Ca^{2+}$-Sensitivität der ATPase-Aktivität bzw. der Kraftentwicklung erzielt.

### 8.1 Desensibilisierungsexperimente

#### 8.1.1 Desensibilisierung des Myosins

Zur Identifizierung der EDTA-extrahierbaren leichten Kette wurde das Myosin (s. Abb. 32, a) aus der Längsmuskulatur bei 30° C mit 10 $mmol \cdot l^{-1}$ EDTA behandelt. Dadurch wurde die $LC_2$ (s. Abb. 32, b) entfernt. Durch die EDTA-Behandlung war die aktinaktivierte ATPase-Aktivität beeinträchtigt und in $Ca^{2+}$-Anwesenheit von 119 auf 49 nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$ reduziert. Die Aktivität ohne $Ca^{2+}$ war von der Behandlung nicht deutlich beeinflußt. Sie betrug vorher 34 nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$ und nachher 38 nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität der aktinaktivierten ATPase-Aktivität sank um 50%.

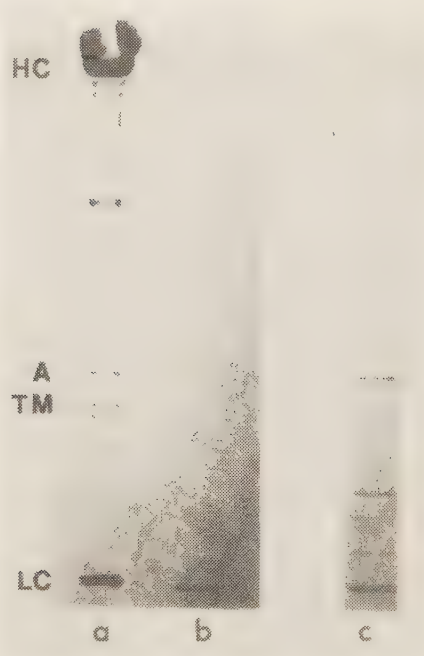


Abb. 32: SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese
a) Myosin aus der Längsmuskulatur,
b) EDTA-extahierte leichte Kette,
c) EDTA-Extrakt aus dem Aktomyosin
HC, Schwere Kette des Myosins;
A, Aktin; TM, Tropomyosin; LC,
Leichte Kette

### 8.1.2 Desensiblisierung des Aktomyosins

Aus dem Aktomyosin von Sipunculus nudus wurde durch EDTA-Behandlung (30° C und 0° C) hauptsächlich die auch vom Myosin durch EDTA abgelöste LC aber auch geringe Mengen Tropomyosin, Troponin sowie Aktin extrahiert (s. Abb. 32, c). Das so desensibilisierte Aktomyosin hatte in Gegenwart von $Ca^{2+}$ fast die gleiche ATPase-Aktivität (269 mmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$) wie vor der Behandlung (267 nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$). Die enzymatische Aktivität war unbeeinträchtigt. Die Aktivität

ohne $Ca^{2+}$ nahm von 17 nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$ auf 188 nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$ zu, d.h. die $Ca^{2+}$-Sensitivität sank um etwas mehr als 60% (s. Tab. I, a; s. S. 76). Die Temperatur allein führte bei nicht EDTA-behandelten Aktomyosin zu einer Reduktion der $Ca^{2+}$-Sensitivität um 12%.

Wird Aktomyosin zusammen mit einem Überschuß HMM oder unreguliertem Aktin vom Vertebratenskelettmuskel inkubiert, so konkurrieren diese unregulierten Proteine mit den entsprechenden regulierten des Aktomyosins um den Reaktionspartner. Weisen die Kombinationen von Konkurrent (Aktin oder HMM) und Pendant (Myosin oder Aktin des Aktomyosins) $Ca^{2+}$-Sensitivität in der ATPase-Aktivität auf, so kann auf die Lokalisation der $Ca^{2+}$-Kontrolle geschlossen werden (kompetetiver Aktin- und Myosin-Aktivierungstest; Lehmann und Szent-Györgyi, 1975).

Da das Aktomyosin von Sipunculus nudus dual reguliert ist (Schäper, 1982), erhält man bei Zugabe von Aktin oder HMM in beiden Fällen $Ca^{2+}$-Abhängigkeit in der ATPase-Aktivität. Gibt man Aktin hinzu, weist man die myosingekoppelte Regulation nach. Sie scheint, eine Hybridisierung vorausgesetzt, noch maximal wirksam zu sein, denn die $Ca^{2+}$-Sensitivität mit Aktin war ebenso hoch wie die des nativen Aktomyosins allein (93%). Fügte man HMM zur Bestätigung der aktingekoppelten Regulation hinzu, war die $Ca^{2+}$-Sensitivität geringer (62 %) (s. Tab I, a).

Nach der EDTA-Behandlung natte das Aktomyosin-System, wenn Aktin zugegeben wurde, etwa die gleicne Sensitivität wie das Aktomyosin ohne den unregulierten Reaktionspartner. Die dabei erhaltene $Ca^{2+}$-Sensitivität (s. Tab. I, a) des desensibilisierten Aktomyosins läßt vermuten, daß die Desensibilisierung des Myosins nicht vollständig war. Wurde mit HMM inkubiert, zeigte sich, daß die $Ca^{2+}$-Sensitivität wie beim unbehandelten Aktomyosin etwa um den gleichen Prozentsatz geringer war. Myosin- und aktingekoppelte Regulation scheinen durch die EDTA-Behandlung beeinträchtigt zu werden.

Die Resensibilisierungsversuche (s. Tab. I, b) am EDTA-desen-

sibilisierten Aktomyosin werden am Ende dieses Kapitels näher erläutert.

| | $Mg^{2+}$-ATPase-Aktivität nmol $P_i \cdot mg\ Prot.^{-1} \cdot min^{-1}$ | | $Ca^{2+}$-Sensitivität % |
|---|---|---|---|
| a) Aktomyosin (0,3 mg) | Ca | EGTA | |
| unbehandelt | 267 | 17 | 94 |
| + Aktin (1:2) | 261 | 17 | 93 |
| + HMM (1:2) | 477 | 181 | 62 |
| EDTA behandelt | 269 | 188 | 30 |
| + Aktin (1:2) | 270 | 180 | 33 |
| + HMM (1:2) | 449 | 356 | 21 |
| b) + DTNB-LC (1:43) | 241 | 110 | 54 |

Tab.I

a) Demonstration der dualen Regulation in der ATPase-Aktivität bei nativem und EDTA-desensibilisierten Aktomyosin aus dem Hautmuskelschlauch von Sipunculus nudus mit dem sogenannten kompetetiven Aktin- und Myosin-Aktivierungstest. HMM und das unregulierte Aktin stammten aus der Kaninchen-Skelettmuskulatur.

b) ATPase-Aktivität des mit der DTNB-extrahierten leichten Kette rekombinierten EDTA-desensibilisierten Aktomyosins

Inkubationsmedien: 20 $mmol \cdot l^{-1}$ KCl; 30 $mmol \cdot l^{-1}$ Tris-Maleat pH 7,0; 2 $mmol \cdot l^{-1}$ $MgCl_2$; 1$mmol \cdot l^{-1}$ ATP; 0,1 $mmol \cdot l^{-1}$ $CaCl_2$ oder 2 $mmol \cdot l^{-1}$ EGTA; Die Proben wurden für 10 min bzw. 30 min bei Zimmertemperatur präinkubiert.

### 8.1.3 Desensibilisierung der gehäuteten Fasern

Wurden genäutete Faserbündel aus der Longitudinalmuskulatur von Sipunculus nudus mit EDTA (10 mmol·l$^{-1}$) und erhöhter Temperatur (35° C) für 30 min behandelt, kontrahierten die Faserbündel im Anschluß daran $Ca^{2+}$-unabhängig. Die Kraftentwicklung ließ sich jedocn durch Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration auf 1,0 x $10^{-5}$ mol·l$^{-1}$ noch steigern. Die Faserbündel waren partiell desensibilisiert. Die absolute $Ca^{2+}$-abhängige Kraftentwicklung der desensibilisierten Faserbündel war reduziert.

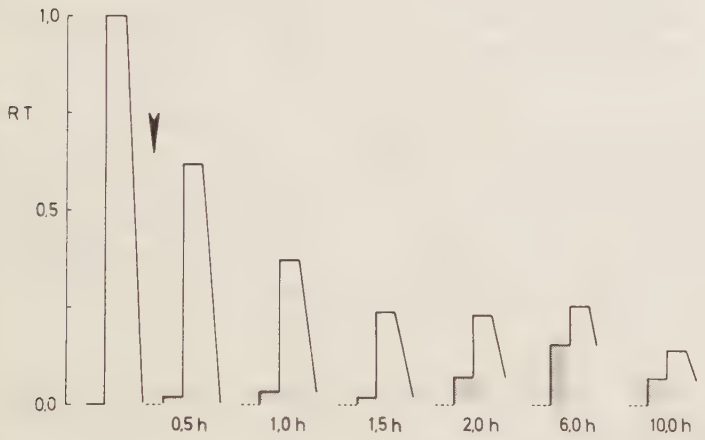


Abb. 33: Schematische Darstellung der relativen Kraftentwicklung der Faserbündel nach verschiedenen Zeiten (0,5 - 10 h) der Desensibilisierung mit 10 mmol·l$^{-1}$ EDTA bei einer Badtemperatur von 15° C. Die Kraftentwicklung ohne $Ca^{2+}$ wurde durch die graue Felderung hervorgehoben. Die Pfeilspitze symbolisiert den Zeitpunkt der EDTA-Behandlung. Die Faserbündel wurden vor der EDTA-Behandlung erst in Rigor-Lösung, dann in $Mg^{2+}$-freier Rigor-Lösung und nach der Behandlung in Rigor-Lösung inkubiert. Die Kraftentwicklung vor der Desensibilisierung wurde gleich 1 gesetzt (links).

Eine Desensibilisierung der Fasern bei 15° C war möglich. In Abb. 33 ist die relative Kraftentwicklung der Faserpräparate nach verschiedenen Inkubationszeiten (0,5 - 10 h) in 10 $mmol \cdot l^{-1}$ EDTA bei 15° C in Erschlaffungs- und Kontraktionspuffer schematisch dargestellt. Erst nach 2-6 h ergab sich eine für Resensibilisierungsversuche brauchbare Desensibilisierung von etwa 40% $Ca^{2+}$-Sensitivität. Nach 10 h hatte die $Ca^{2+}$-Sensitivität nicht weiter abgenommen, die relative Kraftentwicklung war aber gering (14%). Da der Einfluß der De- und Resensibilisierung auf die mechanische Antwort studiert werden sollte, wurde für die weiteren Versuche die 30minütige EDTA-Behandlung bei 35° C gewählt. Dadurch konnte die Dauer des gesamten Experiments verkürzt werden, und die Faserpräparate konnten während der gesamten Inkubationsfolge in der isometrischen Meßanordnung fixiert bleiben.

Eine Erhöhung der EDTA-Konzentration auf 20 $mmol \cdot l^{-1}$ führte nicht zu einer stärkeren Desensibilisierung. Wurden die Faserbündel in EDTA-freiem Puffer bei 35° C inkubiert, ergab sich nur eine geringe temperaturbedingte Desensibilisierung, die $Ca^{2+}$-Sensitivität sank um 7%. Die Kraftentwicklung wurde in diesen Kontrollen allerdings um etwa 25% gesenkt.

## 8.2 Versuche zur Resensibilisierung der gehäuteten Fasern

### 8.2.1 Hohe $Mg^{2+}$-Konzentration

Wie zuvor beschrieben, wurden die Fasern im eingespannten Zustand desensibilisiert. Dem dabei erhaltenen EDTA-Extrakt wurde 10 oder 20 $mmol \cdot l^{-1}$ $Mg^{2+}$ zugesetzt. Mit der Überlegung, daß die extrahierten Proteine unter diesen Bedingungen wieder an die desensibilisierten Fasern binden würden, wurden die Faserpräparate darin zur Resensibilisierung inkubiert. Die Ergebnisse waren nicht eindeutig und unterschieden sich nur in einigen Fällen gering von der in Abb. 38 gezeigten Registrierung eines Kontrollexperimentes zur Resensibilisierung.

### 8.2.2 EDTA-Extrakt aus Myofibrillen

Im weiteren wurde ein EDTA-Extrakt aus einem Homogenat gehäuteter Faserbündel hergestellt (s. II., 6.1). Verwendet wurden dabei die gleichen Puffer, mit denen auch die Faserbündel in der Versuchsapparatur desensibilisiert wurden. Die Faserpräparate wurden nach der Desensibilisierung und nach dem Auslösen der $Ca^{2+}$-unabhängigen und $Ca^{2+}$-abhängigen Kraftentwicklung in Erschlaffungspuffer mit dem Extrakt (1,8 mg Protein·$ml^{-1}$) inkubiert.

Abb. 34: Kontraktionsprotokoll der Kraftentwicklung nach der Desensibilisierung, sowie das der anschließenden Resensibilisierung mit einem EDTA-Extrakt aus Myofibrillenhomogenat. Der Zeitpunkt der Desensibilisierung wurde durch die Pfeilspitze markiert. Der Desensibilisierung mit EDTA folgte eine Inkubation der Faserbündel in $Mg^{2+}$-freier Rigor-Lösung und in Rigor-Lösung. Der Beginn der Inkubation zur Resensibilisierung des Präparates (1,8 mg Protein·$ml^{-1}$ Erschlaffungspuffer) wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Wie aus Abb. 34 hervorgeht, erhielt man eine mechanisch Antwort mit restaurierter $Ca^{2+}$-Sensitivität. Das beinhaltet daß das Faserbündel wieder in $Ca^{2+}$-Abwesenheit auf das Ausgangsniveau erschlafft und in $Ca^{2+}$-Anwesenheit kontrahiert Die $Ca^{2+}$-Sensitivität nahm wieder von 21 % auf 100 % zu. Die Amplitude der durch $Ca^{2+}$ hervorgerufenen absoluten Kraftentwicklung war vor (1,4 mN) und nach (1,34 mN) der Resensibilisierung nahezu gleich.

Aus der SDS-Gelelektrophorese ist zu ersehen (s. Abb. 35), daß neben der LC des Myosins auch TN, TM und Aktin aus den Myofibrillen des Homogenats entfernt wurden. Im Extrakt waren somit verschiedene Proteine die für eine Desensibilisierung und die erreichte Resensibilisierung verantwortlich sein könnten.

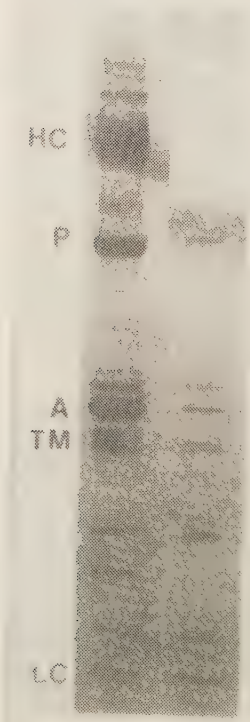


Abb. 35: Auftrennung des Myofibrillenhomogenats (a) und des EDTA-Extraktes (b) aus gehäuteten Längsfaserbündeln in der SDS-Gelelektrophorese; HC, Schwere Kette des Myosins; P, Paramyosin; A, Aktin; TM, Tropomyosin; LC, Leichte Kette des Myosins.

### 8.2.3 DTNB-extrahierte leichte Kette

Es sollte im Folgenden gezeigt werden, daß die Regulation der Kraftentwicklung und die Desensibilisierung eindeutig mit dem Myosin verknüpft sind. Dazu wurden die leichten Ketten aus dem Myosin von Sipunculus nudus isoliert und für die Resensibilisierungsversuche eingesetzt. Es wurde ein DTNB-Extrakt (s. II. 7) hergestellt, der über eine Affinitätssäulenchromatographie getrennt wurde (s. II. 8).

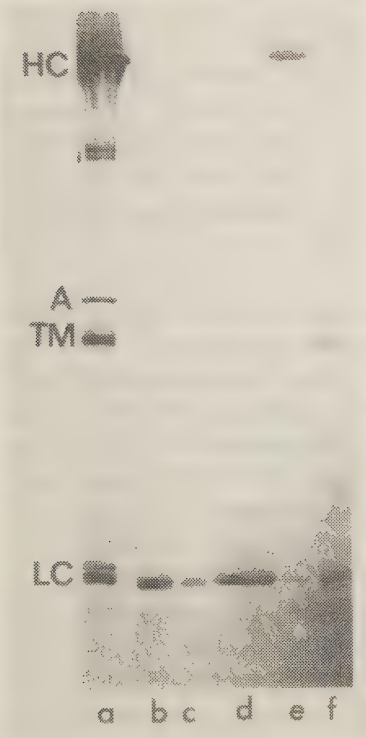


Abb. 36: SDS-Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese
a) Myosin aus der Ringmuskulatur
b) DTNB-LC-Fraktion
c) PS-Fraktion
d) EDTA-Extrakt aus extrahiertem Myosin aus der Längsmuskulatur
e) DTNB-behandeltes Myosin aus dem Hautmuskelschlauch
f) "Peak"-Fraktion
HC, Schwere Kette des Myosins; A, Aktin; TM, Tropomyosin; LC, Leichte Kette des Myosins

Die regulatorischen leichten Ketten sollten in dieser Affinitätschromatographie aufgrund inrer Bindung an den immobilisierten Farbliganden von den anderen Komponenten des Extraktes getrennt werden.

Wie die SDS-PAGGE zeigt (s. Abb. 36, b) eluierte die EDTA-LC identische leichte Kette schon beim Waschen der Säule mit geringer Ionenstärke (DTNB-LC-Fraktion). Ein Teil konnte noch mit hoher Ionenstärke eluiert werden und aufgrund des Funktionstests charakterisiert werden (s. unten). Sie eluierten in der "Peak"-Schulter (PS-Fraktion; s. Abb. 36, c). Die "Peak"-Fraktionen selbst enthielten LC und Tropomyosin (s. Abb. 36, f). Die gebundenen Proteine eluierten in einem einzigen Peak mit scharfer Front.

Zunächst wurden die leichten Ketten der DTNB-LC-Fraktion für die Resensibilisierung eingesetzt. In dem in Abb. 37 dargestellten Kontraktionsprotokoll erkennt man, daß das Faserbündel zunächst desensibilisiert wurde. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität betrug hier nur noch 39%. Das desensibilisierte Präparat zeigte mit ITP keine Kraftentwicklung.

Inkubierte man die in Kontraktionspuffer maximal kontrahierte desensibilisierte Faser in Erschlaffungspuffer, so erschlaffte sie nur auf das Niveau der $Ca^{2+}$-unabhängigen Kraftentwicklung. Wurden anschließend dem Erschlaffungspuffer die leichten Ketten des Waschschrittes zugegeben (0,55 mg Protein/ml Erschlaffungspuffer; 15 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP), ging die Kraftentwicklung vollständig auf das Ausgangsniveau zurück. Das Präparat erschlaffte in $Ca^{2+}$-Abwesenheit. Im Anschluß an diese Resensibilisierung kontrahierte das Faserbündel wieder mit ITP und zeigte mit ATP ebenfalls eine $Ca^{2+}$-abhängige Kraftentwicklung mit einer $Ca^{2+}$-Sensitivität von 100 %. Wie nach der Inkubation der desensibilisierten Faserbündel mit dem EDTA-Extrakt aus den Myofibrillen war die mit $Ca^{2+}$ auslösbare absolute Kraftentwicklung vor und nach der Resensibilisierung mit 7,7 mN bzw. 7,5 mN fast gleich.

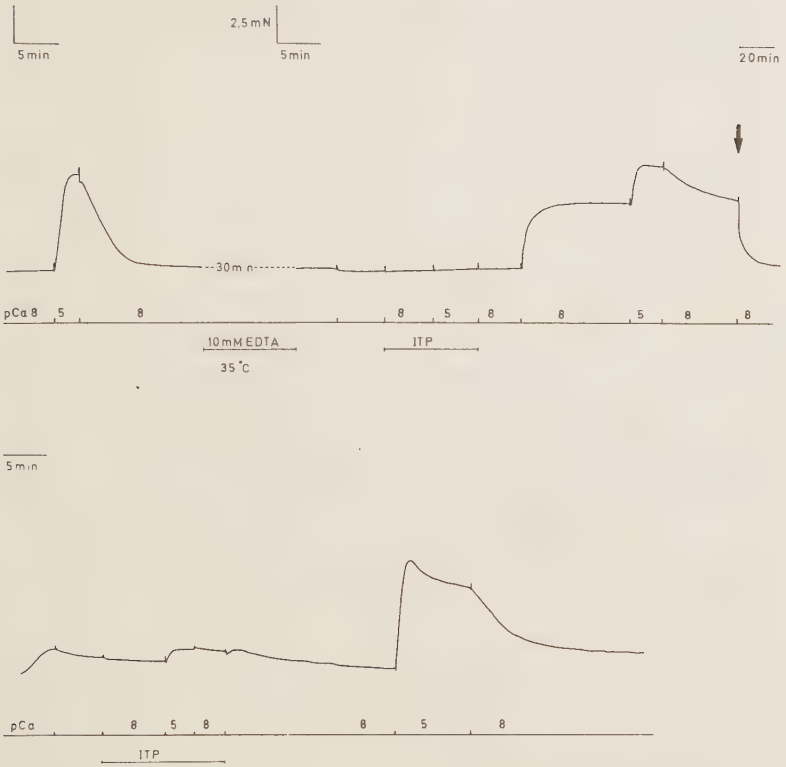


Abb. 37: Kontraktionsprotokoll der Kraftentwicklung vor und nach der Desensibilisierung, sowie der anschließenden Resensibilisierung mit der DTNB-LC-Fraktion. Der Zeitraum der Desensibilisierung wurde durch die gestrichelte Linie symbolisiert. Nach der De- und Resensibilisierung wurden die Faserbündel zunächst jeweils in $Mg^{2+}$-freier Rigor-Lösung und dann in Rigor-Lösung inkubiert. Der Beginn der Inkubation zur Resensibilisierung des Präparates (0,55 mg Protein·$ml^{-1}$ Erschlaffungspuffer) wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet. ATP wurde dort wo es angegeben ist durch ITP substituiert.

In der Kontrolle zur Resensibilisierung (s. Abb. 38) zeigte sich, daß nach Erschlaffung in Erschlaffungspuffer mit 15 mmol·$l^{-1}$ ATP zwar eine $Ca^{2+}$-abhängige Kraftentwicklung auszulösen war (2,24 mN), daß diese aber nicht die Amplitude

der Kraftentwicklung in $Ca^{2+}$-Anwesenheit vor der Resensibilisierung erreichte (7,38 mN).

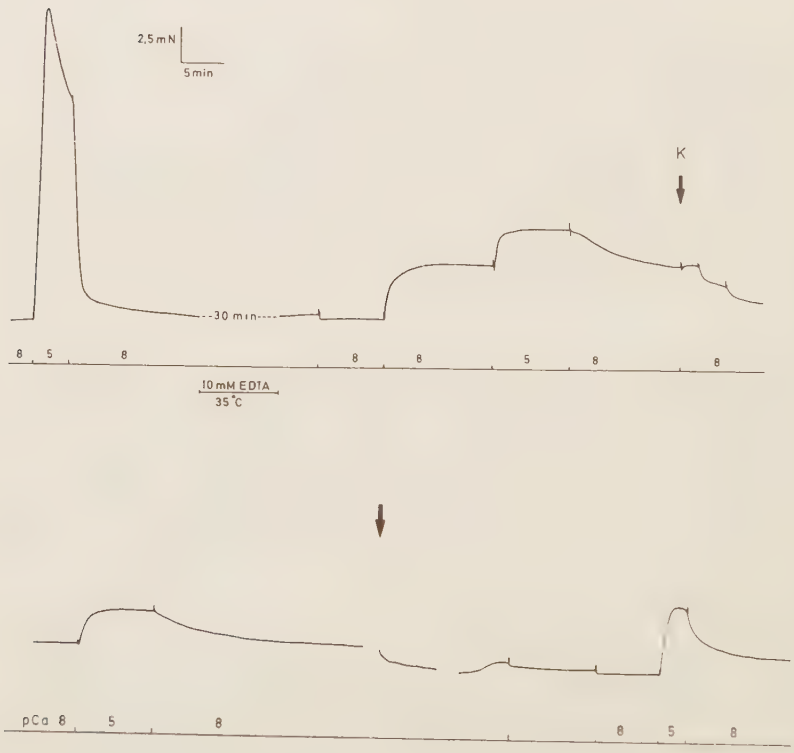


Abb. 38: Kontraktionsprotokoll der Kraftentwicklung vor und nach der Desensibilisierung. Für die Kontrolle zur Resensibilisierung wurde das Faserbündel nur mit Erschlaffungspuffer und 15 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP erschlafft. Der Beginn der Inkubation ist durch den Pfeil mit K markiert. Der andere Pfeil markiert den Inkubationsbeginn in Erschlaffungspuffer mit 0,55 mg DTNB-LC·$ml^{-1}$ und 15 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP. Die Kontrollfaser war zu resensibilisieren. Nach der De- und Resensibilisierung wurden die Faserbündel zunächst in $Mg^{2+}$-freier Rigor-Lösung und dann in Rigor-Lösung inkubiert.

Die Höhe der Amplitude ließ vermuten, daß die erzielte $Ca^{2+}$-abhängige Kontraktion eher einem Teil der noch $Ca^{2+}$-abhängigen Kontraktion (3,0 mN) vor der Resensibilisierung entsprach und keine Wiederherstellung der $Ca^{2+}$-Sensitivität bedeutete. Das wurde auch dadurch bestätigt, daß die $Ca^{2+}$-abhängige Kraftentwicklung wieder zunahm, wenn die Kontrollfasern anschließend mit den DTNB-LC inkubiert worden waren.

In Abb. 39 sind die Ergebnisse der De- und Resensibilisierung schematisch zusammengefaßt. Nach EDTA-Behandlung für 30 min bei 35° C kam es zu einer Desensibilisierung mit 41 ± 8 % (n = 16) $Ca^{2+}$-Sensitivität (s. Abb. 39, b). Die durch $Ca^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung war auf 30 ± 6 % (n = 16) der vorher auslösbaren Kraftentwicklung reduziert. Die Resensibilisierung wurde in jedem Fall (n = 4) mit 100% $Ca^{2+}$-Sensitivität innerhalb von 30 min erzielt (s. Abb. 37, c). Vor und nach der Resensibilisierung war die mit $Ca^{2+}$ auslösbare absolute Kraft nur unwesentlich verändert. Sie betrug vorher 35 ± 2,6% (n = 4) und nachher 33 ± 2,7 % (n = 4) der Kraftentwicklung der unbehandelten Faserbündel. Eine Wiederherstellung der Kraftentwicklung der Fasern wurde nicht beobachtet.
Wurde eine resensibilisierte Faser noch einmal desensibilisiert, verringerte sich die Kraftentwicklung weiterhin auf ein Drittel, und die $Ca^{2+}$-Sensitivität nahm auf die Hälfte ab.

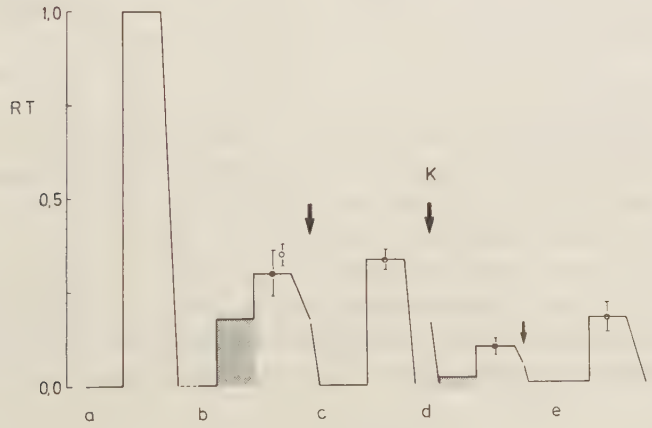

Abb. 39: In schematischer Darstellung wurden die Ergebnisse der De- und Resensibilisierung zusammengefaßt (s.S. 77). Die relative Kraftentwicklung der jeweils zunächst in Erschlaffungspuffer und dann in Kontraktionspuffer inkubierten Faserbündel soll durch die Höhe der Säulen verdeutlicht werden. Die Pfeile symbolisieren die Inkubation in Erschlaffungspuffer mit 15 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP und 0,55 mg $DTNB\text{-}LC \cdot ml^{-1}$ (Ausnahme: K). Die $Ca^{2+}$-unabhängige Kraftentwicklung wurde durch die graue Felderung hervorgehoben.

a) Die Kraftentwicklung der unbehandelten Faserbündel wurde gleich 1 gesetzt. Null entspricht dem Ausgangsniveau.

b) Relative Kraftentwicklung der desensibilisierten Faserbündel; geschlossenes Symbol: mittlere relative Kraftentwicklung der desensibilisierten Faserbündel in Kontraktionspuffer (n = 16)

c) Relative Kraftentwicklung der nach Zugabe der DTNB-LC-Fraktion erschlafften Faserbündel; offenes Symbol: mittlere relative Kraftentwicklung der desensibilisierten (n = 4; s. b)) sowie resensibilisierten (s. c)) Faserbündel in Kontraktionspuffer - Beachte, daß die $Ca^{2+}$-unabhängige Kraftentwicklung fortfällt.

d) Relative Kraftentwicklung der Kontrollen zur Resensibilisierung - K symbolisiert den Beginn der Inkubation der desensibilisierten Faserbündel in Erschlaffungspuffer mit 15 $mmol \cdot l^{-1}$ ATP. Geschlossenes Symbol: mittlere $Ca^{2+}$-abhängige Kraftentwicklung (n = 3)

e) Relative Kraftentwicklung der in Folge (zu d) durch die Proteine der DTNB-LC-Fraktion resensibilisierten Kontrollfasern; offenes Symbol: mittlere relative Kraftentwicklung in Kontraktionspuffer (n = 3)

In den Kontrollen zur Resensibilisierung (s. Abb. 39, d) war die $Ca^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung gering. Sie betrug etwa 10% der maximalen Kraftentwicklung der unbehandelten Faserbündel. Das entspricht der noch $Ca^{2+}$-abhängigen Kraft der desensibilisierten Faserbündel mit 12 %.

Anscheinend blieb in den Kontrollen die Zahl der $Ca^{2+}$-regulierten Interaktionsstellen gleich, während durch die Resensibilisierung mit den LC wahrscheinlich wieder alle bei der Desensibilisierung nicht beeinträchtigten Interak-

tionsstellen durch $Ca^{2+}$-Regulatorproteinkomplex genemmt und enthemmt werden konnten. Die Kontrollen ließen sich mit der DTNB-LC im weiteren resensibilisieren (s. Abb. 39, e).

Die Proteine der DTNB-LC-Fraktion wurden 10 min lang erhitzt. Es bildete sich kein Koagulat. Die Proteine der behandelten Fraktion wurden daraufhin auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich der Resensibilisierung der Faserpräparate untersucht. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität lag vor der Resensibilisierung bei 42% und nach der Resensibilisierung bei 92%. Die absolute Kraftentwicklung mit $Ca^{2+}$ war vor und nach der Resensibilisierung wiederum gleich. Da die Wirksamkeit der DTNB-LC-Fraktion nur minimal beeinflußt wurde, kann angenommen werden, daß die DTNB-extrahierte leichte Kette des Myosins von Sipunculus nudus durch Hitzebehandlung nicht irreversibel zu denaturieren ist.

Trägt man die Abhängigkeit der relativen Kraftentwicklung der de- und resensibilisierten Faserpäparate von der freien $Ca^{2+}$-Konzentration auf (s. Abb. 40), so ist zu erkennen, daß die leichte Kette als Kontrollprotein eine entscheidende Rolle in der $Ca^{2+}$-Regulation der Kraftentwicklung spielt. Durch die EDTA-Behandlung verlor das System seine Regulationskapazität im micromolaren Bereich. Bei einer $Ca^{2+}$-Konzentration von 2,5 x $10^{-7}$ mol·$l^{-1}$ (pCa 6,6) entwickelten die desensibilisierten Faserbündel bereits 62 % der mit 7,9 x $10^{-6}$ mol·$l^{-1}$ $Ca^{2+}$ (pCa 5,1) maximal induzierbaren Kraft. Der Hill-Koeffizient von $n_H$ = 0,6 $\pm$ 0,01 macht deutlich, daß keine positive Kooperativität in der $Ca^{2+}$-abhängigen Kraft der desensibilisierten Faserbündel mehr vorliegt.

Das resensibilisierte Präparat hatte im micromolaren Konzentrationsbereich wieder hohe Regulationskapazität, wie die sigmoide Dosis-Wirkungskurve zeigt (s. Abb. 40). Sie ist der der unbenandelten Fasern annähernd gleich. Der Hill-Koeffizient war $n_{50}$ = 2,2 $\pm$ 0,32. Die halbmaximale Kraftentwicklung wurde bei einer $Ca^{2+}$-Konzentration von 2,2 x $10^{-6}$ mol·$l^{-1}$ (pCa 5,66) erreicht. Bei den desensibilisierten Faserbündeln war eine mehr als 1000fache Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration

erforderlich, um die relative Kraftentwicklung von 10% auf 90% zu steigern. Bei den resensibilisierten Faserbündeln war eine 5- bis 10fache Erhöhung ausreichend. Die Regulation der Interaktion war durch die Zugabe der DTNB-LC wiederherzustellen. Die Proteine der "Peak"-Fraktionen (1,4 $mg \cdot ml^{-1}$) hatten keine resensibilisierenden Eigenschaften, denn nach der Erschlaffung der desensibilisierten Fasern in Anwesenheit der Proteine dieser Fraktion war keine Veränderung bzw. Zunahme der $Ca^{2+}$-abhängigen Kraftentwicklung zu erreichen (0,97 mN bzw. 0.85 mN).

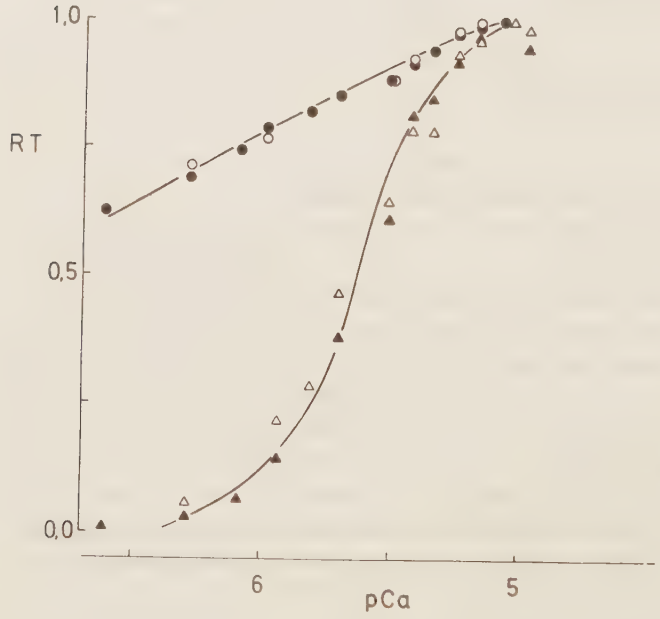


Abb. 40: Effekt der De- und Resensibilisierung der Längsmuskelfaserpräparate auf die Abhängigkeit der relativen Kraftentwicklung bei verschiedenen $Ca^{2+}$-Konzentrationen
Kreise (desensibilisiertes Faserbündel; 30 min in 10 $mmol \cdot l^{-1}$ EDTA bei $35^{o}$ C) - Dreiecke (de- und resensibilisiertes Faserbündel; Resensibilisierung mit DTNB-LC-Fraktion s. Abb. 37

Mit der PS-Fraktion ließen sich die Faserbündel (0,5 $mg \cdot ml^{-1}$) resensibilisieren. Dabei wurde eine $Ca^{2+}$-Sensitivität von etwa 75% erreicht.

### 8.3 Resensibilisierung des Aktomyosins

Die Wiederherstellung der $Ca^{2+}$-Kontrolle des Aktomyosin-Systems durch die DTNB-LC wurde im ATPase-Test überprüft. Desensibilisiertes Aktomyosin und leichte Ketten wurden im Gewichtsverhältnis von 1:10, 1:20, 1:43 zusammen inkubiert. In allen Fällen wurde eine gleich hohe Resensibilisierung der Aktomyosin-ATPase erreicht. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität erhöhte sich von 30% auf 54-57%. Mit den LC ließ sich eine partielle Restauration der $Ca^{2+}$-Kontrolle der ATPase-Aktivität des Aktomyosins erreichen.

## IV. DISKUSSION

Die schräggestreifte Muskulatur von Sipunculus nudus gehört zu den dual regulierten Muskeln (Schäper, 1982). An extrahierten Proteinen von zwei weiteren Spezies der Sipunculiden konnten Lehman & Szent-Györgyi (1975) und Lehman (1976) ebenfalls einen Dualismus der $Ca^{2+}$-Regulation feststellen. Zum ersten Mal wurde im Rahmen dieser Arbeit unter anderem an isolierten gehäuteten Faserpräparaten aus der Muskulatur von S. nudus die $Ca^{2+}$-Abhängigkeit der Kraftentwicklung und die Bedeutung der myosingekoppelten Regulation für diesen Zusammenhang studiert.

Durch die Häutung der Faserbündel mit dem nichtionischen Detergens Triton-X-100 ließen sich $Ca^{2+}$-sensitive Faserpräparate herstellen. Wie ein Teil der Koffeinexperimente zeigt (s. S. 35, Abb. 8) ist nach etwa 90 Minuten die Häutung und auch die Auflösung der Membranen des SR vollständig. Die Aufhebung der Permeabilitätsbarrieren bedeutet eine mehr oder weniger freie Zugänglichkeit der zugesetzten Substanzen zum kontraktilen Apparat und eine Kontrollmöglichkeit für das ihn umgebende Milieu.

### 1. Koffeininduzierte Kraftentwicklung

In den gehäuteten Fasern von S. nudus ließ sich im Anschluß an einen Kontraktions-Erschlaffungs-Zyklus mit Koffein (20 $mmol \cdot l^{-1}$) in $Ca^{2+}$-Abwesenheit eine Kraftentwicklung auslösen. Das heißt, in den Längsmuskelpräparaten sind koffeinsensitive Stellen vorhanden. Mit zunehmender Dauer der Vorinkubation in Triton-X-100 wurde diese mechanische Antwort nach dem Kontraktions-Erschlaffungs-Zyklus geringer und blieb schließlich nach 90minütiger Häutung (s. S. 35, Abb. 8) völlig aus. Da diese koffeinsensitiven Stellen offenbar durch Triton-X-100 beeinträchtigt werden, scheint ihre Wirkung membrangebunden zu sein. Vermutlich sind sie in den Membranen der subsarkolemmalen Zisternen, die von deEguileor & Valvassori (1977) für S. nudus beschrieben wurden, lokalisiert und in-

duzieren bei Koffeinapplikation eine lokale Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration, die zur Kontraktion führt.

Die koffeininduzierten, oft transitorischen, Kontraktionen in gehäuteten Fasern werden im Zusammenhang mit dem SR in unterschiedlicher Weise erklärt. Gemeinsame Voraussetzung ist scheinbar die Beladung der Präparate mit $Ca^{2+}$. Endo et al. (1977) und Endo et al. (1980) führen eine transitorische Kraftentwicklung zunächst auf eine koffeininduzierte Freisetzung von $Ca^{2+}$ aus dem SR zurück. Stephenson (1981) und Saida & van Breemen (1984) konnten bei gehäuteten Fasern mit Koffein eine Freisetzung von $Ca^{2+}$ in das Inkubationsmedium messen. Übereinstimmend damit, erreichten Su und Hasselbach (1984) an isoliertem SR eine von Koffein dosisabhängige Freisetzung von $Ca^{2+}$.

Hess und Wier (1984) führen die transitorische Kraftentwicklung mit Koffein auf eine vorübergehende Hemmung der $Ca^{2+}$-Aufnahme in das SR durch Koffein zurück. Das würde bedeuten, das Ziel der Koffeinwirkung wäre der Mechanismus der Erschlaffung. Unterstützt wird das durch die Tatsache, daß Koffein bei intakten, vollständig depolarisierten Faserpräparaten eine Kontraktion auslöst. Huddart & Alohan (1981) zeigten am isolierten SR der schräggestreiften pharyngeal Muskulatur von Nereis, daß die zum Teil energieabhängige Rückbindung des $Ca^{2+}$ durch Koffein zu hemmen war.

Die koffeininduzierte Kraftentwicklung wäre unter der Annahme beider Möglichkeiten Hinweis für die Präsenz von funktionell intakten SR-ähnlichen $Ca^{2+}$-Speichern und wurde hier in diesen Experimenten als solcher gewertet. Die Koffeinwirkung beruht möglicherweise auf einer Verschiebung des Gleichgewichts von Aufnahme und Abgabe von $Ca^{2+}$ durch das SR, durch die es zu einem Nettoaustrom an $Ca^{2+}$ und zu einem Anstieg der $Ca^{2+}$-Konzentration in Filamentnähe kommt. Energielieferant für energieabhängige Pumpmechanismen wäre das in allen Medien enthaltene ATP.

Wendt und Stephenson (1983) beschrieben einen weiteren Effekt

von Koffein. Sie konnten in ihrer Arbeit zeigen, daß Koffein dosisabhängig auf die $Ca^{2+}$-Sensitivität der gehäuteten Fasern vom Vertebraten-Herz- und -Skelettmuskel einen reversiblen Einfluß hatte. Sie vermuteten koffeinsensitive Stellen an den Myofilamenten, da die beobachteten Effekte von der Häutungsdauer und -art unabhängig waren.

Wahrscheinlich basieren hier die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe mit Koffein (s. S. 36 ff, Abb. 9-11) auf ähnlichen, direkt an den Myofilamenten angreifenden, Effekten des Koffeins. Koffein löste in submaximaler $Ca^{2+}$-Konzentration, je nach vorher erreichter Kraftamplitude, eine mehr oder minder starke Steigerung der Kraftentwicklung aus. Da diese Steigerung der Kraftentwicklung unbeeinflußt war von der Dauer der Inkubation der Präparate in Triton-X-100 und sogar noch nach 5,5 h in 1%iger Lösung des Detergens registrierbar war, kann man davon ausgehen, daß Membransysteme, deren Lipidbestandteile durch das Detergens innerhalb von Minuten aufgelöst werden, nicht mehr daran beteiligt waren.

In Abb. 11 (s. S. 38) wurden die Ergebnisse so zusammengefaßt, daß eine Verschiebung der pCa-Spannungskurve zu höheren pCa-Werten durch Koffein, wie sie von Wendt und Stephenson (1983) gefunden wurde, vorstellbar wurde. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität erscheint erhöht. $Ca^{2+}$-Bindungsstudien an isolierten $Ca^{2+}$-Rezeptorproteinen in Gegenwart von Koffein könnten möglicherweise demonstrieren, ob Koffein die Affinität der Proteine für $Ca^{2+}$ erhöht. Es läßt sich auch spekulieren, daß Koffein aufgrund seines Puringerüstes auf die Nukleotidbindungsstelle Einfluß nehmen kann und die $Ca^{2+}$-Sensitivität des Aktomyosinsystems verändert. Veränderungen der Aktomyosin ATPase-Aktivität durch Koffein wurden, soweit bekannt, nicht gefunden. Modifikationen der $Ca^{2+}$-Sensitivität von Faserpräparaten durch Modifikation der Nukleotidkonzentration und der Nukleotidart werden später diskutiert.

Die nach einer Inkubation in $Ca^{2+}$-haltigem Puffer auftretende transitorische Kraftentwicklung nach Koffeinapplikation in $Ca^{2+}$-freier Lösung erklären Wendt und Stephenson (1983) mit

einer Erhöhung der $Ca^{2+}$-Sensitivität der Myofilamente durch Koffein in der erschlaffenden Präparation. Die Koffeinkontraktion soll nur so lange andauern, bis $Ca^{2+}$-pufferndes EGTA in die Myofibrillen eingedrungen ist und die $Ca^{2+}$-Konzentration auf eine unterschwellige Konzentration verringert hat. Wäre die in der ersten Experimentserie (s. S. 34 ff) beobachtete koffeininduzierte Kraft darauf zurückzuführen, so müßte sie, unabhängig von der Dauer der Behandlung mit Triton-X-100, in jedem Falle auftreten.

**2. Myosinkinase/-phosphatase-System**

Mit den zur Demonstration eines $Ca^{2+}$-sensitiven Myosinkinase/-phosphatase System eingesetzten Agenzien (CaM, TFP, CPZ, ITP, ATP$\gamma$S und cAMP) konnten keine positiven Ergebnisse für die Faserbündel von S. nudus, wohl aber für die Präparate vom Rattenuterus, erhalten werden. Eine $Ca^{2+}$-CaM-abhängige Reaktion, wie die Phosphorylierung der leichten Ketten durch eine Myosinkinase, ist demnach den indirekten Funktionstests zufolge nicht, wie bei der glatten Muskulatur der Vertebraten, in der $Ca^{2+}$-Regulation der Kraftentwicklung maßgeblich. Die fehlende Aktivierung der Kraftentwicklung durch Calmodulin z. B. oder die ausbleibende Hemmung der $Ca^{2+}$-induzierten Kraftentwicklung durch TFP und CPZ, in Konzentrationen, die calmodulinabhängige Prozesse inhibieren würden, könnten auf einer hohen präparateigenen CaM-Konzentration oder auf dem Vorliegen eines undissoziierten $Ca^{2+}$-CaM-Myosinkinase-Komplexes beruhen (Kerrick & Bolles, 1982).

Da Calmodulin ein sehr konservatives ubiquitäres Protein ist, ist die Wahrscheinlichkeit gering, daß die zugesetzten Calmoduline isoliert aus Geweben von Vertebraten nicht aktivierend wirken konnte. Yazawa et al. (1980) konnten zeigen, daß Calmoduline aus Muskeln mariner Invertebraten sich hinsichtlich des Aktivierungsprofils der Kaninchenskelettmuskel-Myosinkinase kaum von dem CaM des Skelettmuskels unterscheiden. TFP und CPZ würden vermutlich in gleicher Form mit einem Invertebraten-CaM wie mit dem CaM der Vertebraten

interagieren.

Gegen die Beteiligung einer MLCK an der $Ca^{2+}$-Regulation spricht, daß mit ITP eine $Ca^{2+}$-abhängige Kraftentwicklung auszulösen war. Das gilt allgemein für Faserbündel aus Muskeln mit maßgebend aktingekoppelter Regulation oder einer myosingekoppelten Regulation, die über direkte $Ca^{2+}$-Bindung am Myosin erfolgt. Im glatten Vertebratenmuskel bleibt eine $Ca^{2+}$-abhängige Aktivierung der Kraftentwicklung (Watanabe, 1980; Ikebe et al., 1984) oder eine Superpräzipitation des Aktomyosins aus (Cassidy & Kerrick, 1982), da $Mg^{2+}$-ITP für die Myosinkinase ein schlechtes Substrat ist (Pires & Perry, 1977). Übereinstimmend damit wurden die leichten Ketten des Myosins beim Zusatz von ITP als Substrat nicht phosphoryliert (Watanabe, 1980; Ikebe et al., 1984; Cassidy & Kerrick, 1982).

Eine für die $Ca^{2+}$-Regulation der Kraftentwicklung unbedeutende, $Ca^{2+}$-sensititive Phosphorylierung der leichten Ketten, wie sie beim Vertebratenskelettmuskel und auch bei Limulus (Kerrick & Bolles, 1981) vorkommt, kann aufgrund dieser indirekten Experimente allein nicht ausgeschlossen werden. Erste Experimente zum Nachweis einer $Ca^{2+}$-abhängigen Phosphorylierung in Faserbündeln von S. nudus, die mir von Herrn Professor Rüegg an der Universität Heidelberg ermöglicht wurden, konnten keine Phosphorylierung zeigen. Endgültige Aussagen in diesem Punkt erfordern allerdings eingehendere Studien.

In den gehäuteten Faserbündeln von S. nudus hatten TFP-Konzentrationen über $10^{-4}$ $mol \cdot l^{-1}$ einen sofortigen Effekt auf die $Ca^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung, der sich in einer Erschlaffung, in manchen Fällen vergleichbar der in $Ca^{2+}$-Abwesenheit (s. S. 45, Abb. 16), äußerte. TFP scheint in diesen Fällen die Anheftung der Querbrücken völlig zu unterbinden, möglicherweise dadurch, daß es die $Ca^{2+}$-Regulation ausschaltet.

In den Inhibitionsversuchen am extrahierten Aktomyosin von S.

nudus (Schäper, 1982), wurde auch erst bei TFP-Konzentrationen über $10^{-4}$ mol·$l^{-1}$ eine deutlich Inhibition der Aktomyosin-ATPase festgestellt. Die untereinander ähnlichen Hemmkinetiken für die Faserpräparate und für das extrahierte Aktomyosin sind in etwa gleich derjenigen des Skelettmuskelaktomyosins (Sheterline, 1980). In seiner Arbeit konnte Sheterline (1980) durch die Dosis-Wirkungskurven der prozentualen ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der TFP-Konzentration zwischen dem myosingekoppelten und aktingekoppelten Regulationssystem des Aktomyosins aus glattem bzw. quergestreiftem Vertebratenmuskel unterscheiden.

Da die Hemmkinetiken für die Faserpräparate und für das extrahierte Aktomyosin von S. nudus in etwa gleich sind, ist zu vermuten, daß TFP in beiden Fällen auf der gleichen Ebene auf das Aktomyosinsystem einwirkte. Möglich wäre, beachtet man die Hemmkinetik für das Skelettmuskelaktomyosin, eine Beeinflussung des Troponins, die in einer Abnahme der $Ca^{2+}$-abhängigen ATPase-Aktivität und damit der Kraftentwicklung resultiert. Da die Affinität von TnC für TFP geringer ist als die von CaM (Hidaka et al., 1980), werden erst höhere Inhibitorkonzentrationen wirksam.

Nach der Inkubation mit ATP$\gamma$S (2 mmol·$l^{-1}$) kam es in den Längsmuskelpräparaten von S. nudus mit ATP zu einer transitorischen $Ca^{2+}$-unabhängigen, nicht maximalen Kraftentwicklung (s. S. 56, Abb. 26). Das wich deutlich von der mechanischen Antwort der Rattenuterusfaserpräparate ab (s. S. 55, Abb. 25), bei denen die $Ca^{2+}$-unabhängige Kraftentwicklung nach ATP$\gamma$S-Inkubation in $Ca^{2+}$-Gegenwart mit ATP die gleiche Amplitude erreichte wie vor der Behandlung, und die erreichte Kraft persistent war. Die Fasern von S. nudus behielten ihre $Ca^{2+}$-Sensitivität. Hohe Phosphataseaktivität und/oder geringe Resistenz der thiophosphorylierten leichten Kette gegenüber einer endogenen Phosphatase könnten für eine transitorische Kraftentwicklung die Ursache sein (Sparrow et al., 1984). Auch Sparrow et al. (1984) fanden bei den gehäuteten Fasern der Tracheamuskulatur eine wenn auch langsame Abnahme der $Ca^{2+}$-unabhängigen maximalen Kontraktion

mit ATP nach ATP$\gamma$S-Inkubation. Wie die Faserbündel von Sipunculus kontrahierten die glattmuskulären Präparate im Anschluß an die allerdings nicht vollständige Erschlaffung wieder mit $Ca^{2+}$ (Sparrow et al., 1984).

Die Beteiligung einer Myosinkinase, welche offenbar in den Uterispräparaten noch vorhanden war, an der Induktion der $Ca^{2+}$-abhängigen Kontraktion, wurde jedoch aus folgendem Grund ausgeschlossen. Die transitorische $Ca^{2+}$-unabhängige Kraftentwicklung wurde auch ausgelöst, wenn mit ATP$\gamma$S in $Ca^{2+}$-Abwesenheit vorinkubiert wurde. Wäre eine $Ca^{2+}$-CaM-abhängige Phosphorylierung an der Regulation beteiligt, so wäre zu erwarten, daß die Faserbündel von der Präinkubation mit ATP$\gamma$S bzw. von einer Thiophosphorylierung bei unterschwelligen $Ca^{2+}$-Konzentrationen unbeeinflußt blieben (Kerrick & Bolles, 1982).

ATP$\gamma$S führte in den gehäuteten Fasern von Sipunculus nicht zu einer registrierbaren Kraftentwicklung, wenn vorher durch Inkubation mit Hexokinase und Glucose, sowie in ATP-freier Lösung das ATP aus dem Präparat entfernt wurde. ATP$\gamma$S ist somit möglicherweise kein oder nur ein schlechtes Substrat der Aktomyosin-ATPase von S. nudus.

Die transitorische Kraftentwicklung ist an die Zugabe von ATP gebunden, bei Substitution von ATP durch ITP oder in ATP-freier Lösung bleibt sie aus. Sie ist mehrmals, jeweils nach Inkubation mit ATP$\gamma$S zu induzieren. Werden allerdings ATP$\gamma$S und ATP in äquimolaren Konzentrationen angeboten, scheint eine Kompetetion der Nukleotide vorzuliegen, wobei das System eine höhere Affinität zum ATP zu haben scheint, denn im Anschluß daran bleibt die transitorische Kraftentwicklung aus und die Faser erschlafft.

ATP$\gamma$S in einer Konzentration von 2 $mmol \cdot l^{-1}$ wirkt offenbar nur auf einen Teil der Querbrücken ein, da die $Ca^{2+}$-unabhängige transitorische Kraftentwicklung im Mittel nur etwa 13% der maximalen Kraftentwicklung beträgt. Eine Modifikation der Querbrücken oder anderer Stellen durch Thiophosphory-

lierung ist denkbar, wahrscheinlich scheint aber eine Bindung von ATP$\gamma$S an die Nukleotidbindungsstellen, die einen Teil der Querbrücken in einen derartigen Zustand versetzt, daß sie in Aktinnähe gerückt werden und $Ca^{2+}$-unabhängig kontraktionswirksam interagieren können (Daten nicht gezeigt). Eine $Ca^{2+}$-unabhängige Kontraktion mit ATP$\gamma$S unterbleibt offensichtlich dann, wenn ATP-freie Querbrücken mit dem Nukleotid besetzt werden (s. S. 56, Abb. 26).

Nach Inkubation mit ATP$\gamma$S bewirkt die Bindung von eindiffundierendem ATP, möglicherweise über die transitorische Konzentrationsänderung innerhalb des Faserbündels von suboptimaler Konzentration bis supraoptimaler Konzentration, die beobachtete Kontraktion und Erschlaffung. Diese Rigor-Kontraktion und die Erschlaffung durch Substratinhibition werden im letzten Abschnitt der Diskussion erläutert. Weitere Querbrückenzyklen sind ausgeschlossen, da die $Ca^{2+}$-Kontrolle als unbeeinträchtigt angenommen wird.

### 3. Die Rolle der Calcium-Ionen

$Ca^{2+}$-abhängige Kontraktion und die Erschlaffung der Faserbündel in $Ca^{2+}$-Abwesenheit waren Indikatoren für die Anwesenheit von $Ca^{2+}$-Regulatorproteinen. Mit der Steigerung der $Ca^{2+}$-Konzentration im micromolaren Bereich nahm die Kraftentwicklung der isolierten gehäuteten Faserbündel von S. nudus stufenweise in charakteristischer Weise, unabhängig von der absoluten maximalen Kraftentwicklung, zu. Das bedeutet, ein hochsensitives Regulationssystem ist nach der Häutungsprozedur noch vorhanden. Bei der Auftragung der relativen isometrischen Kraftentwicklung gegen den negativen Logarithmus der $Ca^{2+}$-Konzentration, nahmen die Kurven einen sigmoiden Verlauf und stiegen innerhalb einer pCa-Einheit an (s. S. 29, Abb. 5). Relativ hohe Hill-Koeffizienten ($n_H > 3$) bestätigten eine positive Kooperativität.

Der Wert des Hill-Koeffizienten ist nicht identisch mit der Anzahl der Liganden-Bindungsstellen (Cornish-Bowden &

Koshland, 1975). Mit ihm läßt sich nur die Mindestzahl der Liganden angeben, die an dem kooperativen Effekt beteiligt sind. Folglich würden hier mindestens 3-4 $Ca^{2+}$-Bindungsstellen hinsichtlich der Kraftentwicklung in positiv kooperativer Weise interagieren. Die meisten der Hillkoeffizienten liegen unabhängig von der Herkunft der Faserpräparate und dem maßgebenden Regulationsmodus zwischen 3 und 4. Wie später diskutiert wird ist die Kooperativität in der Kraftentwicklung entscheidend durch die Substratkonzentration beeinflußbar und muß bei Vergleichen mit beachtet werden.

Ob bei Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration Einflüsse wie z.B die Kraftentwicklung selbst (Bremel & Weber, 1972; Weber & Murray 1973), in einer allosterischen Einheit eine erleichterte Bindung von $Ca^{2+}$ in den Faserbündeln initiieren, kann aus der Amplitude der Kraftentwicklung allein nicht ohne weiteres geschlossen werden (Fuchs & Fox, 1982; Fuchs, 1985), denn die Kraftentwicklung ist möglicherweise keine lineare Funktion der $Ca^{2+}$-Sättigung.

Potentielle Träger für $Ca^{2+}$-Bindungsstellen im Aktomyosinsystem von S. nudus waren, wie eingangs erwähnt, das Myosin und das Troponin. Für das Myosin ließ sich dies im Rahmen dieser Arbeit nachweisen.

## 4. Myosin und die $Ca^{2+}$-Bindung an das Myosin

Die Bindung von $Ca^{2+}$ an die extrahierten Myosine isoliert aus dem HMS von S. nudus und aus dem Kaninchenskelettmuskel wurde mittels einer Gleichgewichtsdialysetechnik über die Bindung von $^{45}Ca^{2+}$ ermittelt. Aus Abb. 30 (s.S. 62), in der die Bindung des Isotops an Myosin gegen die freie $Ca^{2+}$-Konzentration aufgetragen wurde, geht hervor, daß das Myosin aus der Längsmuskulatur und aus der Ringmuskulatur $Ca^{2+}$ mit relativ hoher Affinität bindet.

In den Bindungsstudien wurden 4 $mmol \cdot l^{-1}$ $Mg^{2+}$ vorgegeben, um eine $Ca^{2+}$-Bindung an "nicht-spezifische" Bindungsstellen zu

reduzieren. Der Zusammenhang zwischen $Ca^{2+}$-Konzentration und $Ca^{2+}$-Bindung im micromolaren Bereich, mit einem starken Anstieg der $Ca^{2+}$-Bindung zwischen pCa 6,0 und 5,0, macht deutlich, daß das Myosin von Sipunculus hochaffine und vermutlich $Ca^{2+}$-spezifische Bindungsstellen enthält.

Die Myosine aller Muskeltypen binden $Ca^{2+}$. Die meisten Myosine, einschließlich des Molluskenmuskelmyosins, enthalten zwei hochaffine, sogenannte "nicht-spezifische " $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-Bindungsstellen, die auf den beiden regulatorischen leichten Ketten nahe dem N-terminalen Ende (Kretzinger, 1976) lokalisiert sind (Bagshaw & Kendrick-Jones,1979; Beinfeld et al., 1975; Morimoto & Harrington, 1974; Wikman-Coffelt, 1980). Für die Myosine des Molluskenmuskels wurden zusätzlich zwei hochaffine $Ca^{2+}$-spezifische Bindungsstellen nachgewiesen (Chantler & Szent Györgyi, 1980; Bagshaw & Kendrick-Jones, 1979). Sie erfordern die Beteiligung der regulatorischen leichten Kette und der schweren Kette des Myosins (Bagshaw & Kendrick-Jones, 1979) und binden schnell genug, um an der Aktivierung der Aktomyosin-ATPase beteiligt zu sein (Bennet & Bagshaw, 1986).

Beim Myosin aus dem Vertebratenskelettmuskel und dem Molluskenmuskel verringern $Mg^{2+}$-Konzentrationen von > 1 $mmol \cdot l^{-1}$ die Bindung von $Ca^{2+}$ an das Myosin (Kuwayami und Yagi, 1979), so daß die $Ca^{2+}$-Bindung unter diesen Bedingungen ein Maß für die $Ca^{2+}$-spezifischen Stellen ist (Bagshaw & Kendrick-Jones, 1979). Das Myosin von Mercenaria und Pecten bindet in Gegenwart von 1 $mmol \cdot l^{-1}$ $Mg^{2+}$ 2 mol $Ca^{2+}$/mol Myosin, während das Myosin vom Skelettmuskel nur 0,5 mol $Ca^{2+}$/mol Myosin bindet (Bagshaw & Kendrick-Jones. 1979). Da die freie $Mg^{2+}$-Konzentration in den Muskeln zwischen 2-5 $mmol \cdot l^{-1}$ liegt, kann angenommen werden, daß die nicht spezifischen Bindungsstellen auf dem Myosin unter physiologischen Bedingungen wenig $Ca^{2+}$ binden (Fuchs & Black, 1980) und in der $Ca^{2+}$-Regulation unbedeutend sind.

Das Myosin aus der Längsmuskulatur von S. nudus bindet $Ca^{2+}$ mit annähernd gleicher Affinität wie das Molluskenmyosin

(Kendrick-Jones et al., 1970; Hirata et al., 1980).

Die Titrationskurve von $Ca^{2+}$ mit dem Myosin des Kaninchen-Skelettmuskels lag unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen um mehrere pCa-Einheiten niedriger. Erst bei höheren $Ca^{2+}$-Konzentrationen wurden meßbare Mengen an $Ca^{2+}$ gebunden (s. S. 62, Abb. 30). Die Affinität der $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-Bindungsstellen für $Ca^{2+}$ unter diesen Versuchsbedingungen wurde so beispielhaft demonstriert und erlaubte eine erste Klassifizierung der Art der Bindungsstellen am Myosin von S. nudus.

Bei dieser Klassifizierung der Art der Bindungsstellen wurde davon ausgegangen, daß das Myosin aus der Längsmuskulatur von S. nudus wie das Molluskenmyosin vier hochaffine Bindungsstellen für divalente Kationen enthält. Bei einem pCa von 5,0 hatte das Myosin aus der LM etwa 2 mol $Ca^{2+}$/mol Myosin gebunden. Bei höheren $Ca^{2+}$-Konzentrationen (pCa 3,0) erhöhte sich die $Ca^{2+}$-Bindung auf etwa 3 mol $Ca^{2+}$/mol Myosin. Zwischen pCa 6,0 und pCa 5,0 spiegelte die $Ca^{2+}$-Bindungskurve vermutlich die Titrationskurve zweier hochaffiner $Ca^{2+}$-Bindungsstellen wieder. Bei höheren $Ca^{2+}$-Konzentrationen verdrängt $Ca^{2+}$ wahrscheinlich gebundenes $Mg^{2+}$ auch von den, dem "nicht-spezifischen" Bindungsstellentyp homologen, Bindungsstellen. Das ließ sich daraus schließen, daß zwischen pCa 5,0 und pCa 3,0 mit abnehmendem pCa auch zunehmend $Ca^{2+}$ an das Myosin vom Vertebratenskelettmuskel gebunden wurde. Der Verlauf der Titrationskurve könnte beinhalten, daß die beiden spezifischen Ca-Bindungsstellen etwa bei dem pCa saturiert sind, bei dem eine Induktion der maximalen Kraftentwicklung erfolgt.

Die stark $Ca^{2+}$-abhängige Initiation der ATPase-Aktivität des Hybrids aus dem Myosin von S. nudus und dem unregulierten Aktin vom Kaninchen-Skelettmuskel, bei einer $Mg^{2+}$-Konzentration von 4 mmol $\cdot$ $l^{-1}$, geht wahrscheinlich auf die spezifische Bindung von $Ca^{2+}$ an das Myosin zurück, dem einzigen potentiellen Träger regulatorischer Proteine in diesem Hybrid. Obwohl für das Myosin von Dendrostomum pyroides, einem Sipunculiden, eine $Ca^{2+}$-Bindung nachgewiesen werden konnte,

konnte in dem Fall keine myosingekoppelte Regulation in der ATPase-Aktivität gezeigt werden (Lehman & Szent-Györgyi, 1975; Lehman, 1976).

Ein Vergleich mit der pCa-Abhängigkeit der aktinaktivierten Myosin-ATPase-Aktivität vom Kaninchen-Skelettmuskel macht das Ausmaß der myosingekoppelten $Ca^{2+}$-abhängigen Repression der Enzymaktivität in dem Hybrid manifest. Während das Skelettmuskelmyosin kombiniert mit dem unregulierten Aktin bei pCa 6,6 hohe ATPase-Aktivität hatte, war die ATPase-Aktivität des Hybrids, bestehend aus dem Myosin von S. nudus und reinem Aktin, zu 90% gehemmt.

Die $Ca^{2+}$-ATPase-Aktivität des isolierten Myosins aus S. nudus ist, wie die des Skelettmuskelmyosins, von der $Ca^{2+}$-Konzentration im micromolaren Bereich unabhängig und ist bei Veränderung der $Ca^{2+}$-Konzentration in dem Bereich unverändert hoch. Erst bei höheren $Ca^{2+}$-Konzentrationen wird die Aktivität deutlich stimuliert (s. S. 59, Abb. 28). Die Bindung von $Ca^{2+}$ an das Myosin hat offenbar keinen Einfluß auf die $Ca^{2+}$-abhängige Enzymaktivität des Myosins und kontrolliert nur die $Mg^{2+}$-abhängige Aktomyosin-ATPase-Aktivität.

Interessant war der Befund, daß isoliertes Myosin aus der Ringmuskulatur im micromolaren $Ca^{2+}$-Konzentationsbereich nur ein mol $Ca^{2+}$ pro mol Myosin gebunden hat (s. S. 62, Abb. 30). Es wäre denkbar, daß das Myosin aus der Ringmuskulatur nur eine hochaffine $Ca^{2+}$-spezifische Bindungsstelle hat oder aber, daß ein Gemisch verschiedener Myosinisoformen mit unterschiedlichen $Ca^{2+}$-Bindungseigenschaften vorliegt. Würden z. B. nur die Hälfte der Myosinmoleküle, wie beim Myosin der Längsmuskulatur 2 mol $Ca^{2+}$ pro mol Myosin spezifisch, mit hoher Affinität, binden, wäre das Ergebnis verständlich.

Aus der Abb. 27 (s. S. 58) ist zu erkennen, daß sich Myosin aus Ring- und Längsmuskulatur in der Zusammensetzung der leichten Ketten unterscheiden. Das Myosin der LM enthält nur zwei leichte Ketten ($LC_1$,$LC_2$), während das Myosin der RM drei leichte Ketten ($LC_1$,$LC_2$ und $LC_3$) aufweist. Ob diese Hetero-

genität mit den unterschiedlichen Bindungseigenschaften für $Ca^{2+}$ im Zusammenhang steht bleibt zu klären.

Für die früheren Untersuchungen (Schäper, 1982) wurde Aktomyosin und Myosin aus dem Gewebe des gesamten HMS extrahiert. Die dort in allen Präparationen gefundene scheinbare Disproportionalität der leichten Ketten des Myosins findet in den neuen Ergebnissen eine mögliche Erklärung. Die leichte Kette für die dort eine $M_r$ von 18 700 $\pm$ 500 in der SDS-PAGGE bestimmt wurde und die immer in geringeren Mengen im SDS-Gel auftrat könnte der $LC_1$ des Myosins aus der Ringmuskulatur entsprechen. Die zweite leichte Kette mit einer $M_r$ von 17 700 $\pm$ 450 setzte sich vermutlich zusammen aus zwei, im Gel unvollständig getrennten, leichten Ketten des Ring- und Längsmuskelmyosins. Die Disproportionalität beruhte somit auf dem Verhältnis von Ring- und Längsmuskelgewebe im HMS und darauf, daß $LC_2$ und $LC_3$ bzw. $LC_1$ und $LC_2$ im SDS-Gel zusammenwanderten.

Nach der SDS-PAGGE zu urteilen (s. S. 66, Abb. 32, a und b), ist die $LC_2$ des LM-Myosins die EDTA-LC, die sich aus dem Myosin extrahieren ließ. Ihre regulatorische Bedeutung wird im Folgenden diskutiert.

## 5. Desensibilisierung und Resensibilisierung

Die Entfernung der leichten Ketten mit EDTA (10 $mmol \cdot l^{-1}$) bei 30° C vom Myosin führte zu einer Abnahme der $Ca^{2+}$-Sensitivität der aktinaktivierten Myosin-ATPase-Aktivität um 50%. Dabei wurde die $Ca^{2+}$-abhängige ATPase-Aktivität auf 41% verringert. In $Ca^{2+}$-Abwesenheit nahm sie nur geringfügig zu. Die leichten Ketten hatten möglicherweise, wie bei den Molluskenmuskeln (Chantler & Szent-Györgyi, 1980) einen potenzierenden Einfluß auf die $Ca^{2+}$-abhängige aktinaktivierte Myosin-ATPase-Aktivität. Die Reduktion des Gehaltes an leichten Ketten führte hier allerdings nicht zu einer deutlichen Entkoppelung der $Ca^{2+}$-Regulation von der ATPase-Aktivität, die sich, in Analogie zum Molluskenmyosin, in vermehrter Aktivität der

aktinaktivierten ATPase in $Ca^{2+}$-Abwesenheit äußern würde (Chantler & Szent-Györgyi, 1980). Die Entfernung der leichten Ketten wirkt sich hier nur auf die $Ca^{2+}$-abhängige Umsatzrate des ATP durch Myosin aus. Eine Reduktion der Affinität für das Substrat oder eine Reduktion der Aktin-Aktivierung könnten einerseits dafür ursächlich sein. Andererseits ist eine irreversible Denaturierung eines Teils der Myosinfraktion durch die Wärme- und EDTA-Behandlung nicht völlig auszuschließen. Das das Myosin von S. nudus durch unreguliertes Aktin aktivierbar ist, wurde gezeigt (Schäper, 1982).

Die Behandlung des extrahierten Aktomyosins mit EDTA resultierte ebenfalls in einer Abnahme der $Ca^{2+}$-Sensitivität der ATPase-Aktivität. Hauptsächlich wurden leichte Ketten des Myosins aber auch geringe Mengen TN und TM extrahiert (s. S. 66, Abb. 32, c). Die ATPase-Aktivität mit $Ca^{2+}$ blieb mehr oder weniger durch die Behandlung unbeeinflußt. Die Aktomyosin-ATPase scheint somit bei Temperaturen von 30° C nicht irreversibel denaturiert zu werden. Die Bindung der regulatorischen Proteine im Aktomyosinkomplex ist thermolabil (s. S. 67), denn die Temperaturbehandlung allein führte zu einer Abnahme der $Ca^{2+}$-Sensitivität.

In $Ca^{2+}$-freier Lösung war die Aktivität des desensibilisierten Aktomyosins um etwas mehr als das 10fache gesteigert und betrug 70% der $Ca^{2+}$-abhängigen ATPase-Aktivität nach der Behandlung. Die EDTA-extrahierbaren Proteine, d.h., unter anderem die leichten Ketten des Myosins, sind also im intakten System für die Hemmung der Aktomyosin-ATPase-Aktivität in $Ca^{2+}$-Abwesenheit verantwortlich.

Bestätigt wurde das durch die Rekombination der DTNB-extrahierten leichten Kette mit dem desensibilisierten Aktomyosin, bei der sich die Interaktion von Aktin und Myosin bzw. die ATPase-Aktivität in $Ca^{2+}$-Abwesenheit wiederum teilweise hemmen ließ (s. S. 68, Tab.I und S. 81). Folglich kann die DTNB-LC die EDTA-extrahierte leichte Kette ersetzen. Die Desensibilisierung mit einhergehenden Modifikationen ist reversibel. Es handelt sich also um denselben Typ regula-

torisch wirksamer leichter Ketten, der mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden isoliert wurde.

Zum Nachweis der Auswirkungen der Myosinkontrolle auf die Kraftentwicklung wurden gehäutete Faserbündel von S. nudus mit EDTA, bei neutralem pH in ATP-freier Lösung behandelt. Die Behandlung mit EDTA und 15° bzw. 35° C führte zu einer reversiblen Desensibilisierung. Die Dissoziation der regulatorischen Untereinheiten war offenbar durch die höhere Temperatur begünstigt und beschleunigt.

Da die Muskeln von S. nudus myosin- und aktinreguliert sind (Schäper, 1982), ist bei einer EDTA-Behandlung der Faserpräparate, wie oben für das extrahierte Aktomyosin bereits angedeutet, die Extraktion von Regulatorproteinen beider Systeme, das heißt, zusätzlich zu den regulatorischen leichten Ketten des Myosins die Loslösung des TN - TM Systems, denkbar. Zum Beispiel ließ sich bei den Untersuchungen von Moss et al. (1982) an den Faserbündeln vom Vertebratenskelettmuskel neben der $LC_2$ hauptsächlich TnC durch die EDTA-Behandlung entfernen.

Die gelelektrophoretische Analyse der Proteine des EDTA-Extraktes aus den Myofibrillen der Längsmuskulatur, die etwa in der gleichen Weise behandelt wurden wie die im Versuchsaufbau eingespannten Faserbündel, sollte darüber Aufschluß geben. Sie ergab, daß der Extrakt vor allem LC, aber auch TN, TM und Aktin enthielt (s. S. 72, Abb. 35). Das bedeutete, daß die beobachtete Desensibilisierung auf der Entfernung der regulatorisch wirksamen Proteine beider Regulationssysteme beruhen könnte.

Die Desensibilisierung der Fasern äußerte sich in einer Kontraktion der Fasern in Erschlaffungspuffer, also ohne $Ca^{2+}$ (s. III, 8.1.3). Eine vollständige Desensibilisierung der Präparate wie sie von Simmons und Szent-Györgyi (1978) in einigen Fällen erreicht wurde, ihre Molluskenmuskelfaserpräparate erreichten ohne $Ca^{2+}$ 80-100% der originalen Kraftentwicklung nach der Desensibilisierung, konnte hier nicht

erzielt werden. Da in den desensibilisierten Fasern mit $Ca^{2+}$ noch zusätzlich eine Kraftzunahme initiiert werden konnte, wird von einer partiellen Desensibilisierung gesprochen. Die Kontraktionsprotokolle von Ojima et al. (1984) zeigen ebenfalls nur eine partielle Desensibilisierung der Faserbündel aus dem Adduktormuskel.

Bei einer partiellen Desensibilisierung ist anzunehmen, daß ein Teil der Querbrücken noch reguliert wird. Es kann beim dual regulierten Muskel einerseits bedeuten, daß noch ein kompletter Satz an regulatorischen wirksamen Proteinen, damit sind die Proteine der Aktin- und Myosinkontrolle zusammen gemeint, wirksam ist. Es kann andererseits bedeuten, daß das in der Regulation dominante System nicht vollständig entfernt wurde und zuletzt, daß eines der Systeme vollständig entfernt wurde während das andere die Interaktion weiterhin kontrolliert. Die SDS-Gelelektrophorese gab aufgrund der schlechten Auflösung im Bereich der leichten Ketten keine eindeutige Auskunft, ob die regulatorische leichte Kette vollständig entfernt war. Troponinkomponenten schienen in den desensibilisierten Präparaten noch vorhanden zu sein.
Eine mögliche Begründung für eine unvollständige Entfernung der regulatorischen Proteine könnte z.B. in einer unterschiedlichen Extrahierbarkeit der Proteine in verschiedenen intermediären Zuständen des Querbrückenzyklus zu finden sein (Meinrenken, 1969; Ojima et al., 1983).

Die EDTA- und Temperatur-Behandlung führte bei den Faserbündeln von S. nudus zu einer Abnahme der ATP-induzierten Kraftentwicklung in $Ca^{2+}$-Anwesenheit. Nach der 30minütigen Desensibilisierung reduzierte sich die Kraftentwicklung bei den Faserpräparaten von S. nudus auf 30% der vor der Behandlung mit $Ca^{2+}$ auslösbaren Kraftentwicklung.

Suzuki et al. (1981) und Ojima et al. (1984) merkten eine Abnahme der Kraftentwicklung für die Faserbündel der Molluskenadduktoren an, und auch im Vertebratenskelettmuskel registrierten Moss et al. (1982) einen Verlust der Kraftentwicklung nach EDTA-Behandlung. Die $Ca^{2+}$-induzierte Super-

präzipitation von EDTA-desensibilisierten Myosin mit Aktin war fast vollständig gehemmt (Ojima et al., 1984).

Die Rekombination der Fasern mit den extrahierten leichten Ketten führte zu einer Zunahme der Spannungsentwicklung und die Geschwindigkeit der Kraftentwicklung wurde wiederhergestellt (Suzuki et al., 1980; Ojima et al., 1984). Auch die Hemmung der Superpräzipitation durch die Desensibilisierung war reversibel (Konno et al., 1980; Ashiba et al., 1980, Ojima et al., 1984). Der Effekt scheint mit den leichten Ketten verknüpft, so daß Suzuki et al. (1981) für die LC nicht nur eine $Ca^{2+}$-regulatorische Rolle vorschlagen, sondern annehmen, daß die LC die Myosin Konformation derart beeinflussen, daß die Köpfe effektiv mit Aktin interagieren können. Der Entfernung der leichten Ketten folgt eine Änderung, die auf bisher ungeklärte Weise zur Entkoppelung von ATPase-Reaktion und Kraftentwicklung oder Superpräzipitation führt (Suzuki et al., 1980).

Eine Beeinflussung der Myosinkonformation durch Entfernung der regulatorischen leichten Ketten ist in der Tat von Flicker et al. (1983) für Myosin aus Aquipecten irradians beschrieben. Sie fanden, daß die Köpfe im Myosinmolekül, wie auch die S1-Einheiten eine Deformation nach der EDTA-Behandlung aufweisen. Hatte der "$Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-Kopf" eine längliche birnenförmige Gestalt (Elliot & Offer, 1978), so ist der "EDTA-Kopf" geschrumpft und rundlicher, und die "Nackenregion" des Myosinkopfes, vermutlich der Sitz der regulatorischen leichten Kette, scheint kollabiert zu sein. Es wäre denkbar, daß eine derartige Konformationsänderung auch im filamentintegrierten Myosinmolekül bei der EDTA-Behandlung der Faserbündel vonstatten geht und die Kraftentwicklung in Abhängigkeit von Calcium verändert.

Mit den Proteinen des EDTA-Extraktes aus den Myofibrillen und mit der DTNB-extrahierten-LC aus dem Myosin, isoliert aus dem Hautmuskelschlauch von S. nudus, waren die Faserbündel resensibilisierbar. Eine Rekombination der extrahierten regulatorischen Proteine mit den Faserpräparaten war somit wie

bei dem extrahierten Aktomyosin funktionell nachweisbar und bestätigte die Unversehrtheit der Proteine nach der Extraktion. Die originale Kraftentwicklung ließ sich jedoch nicht wieder nerstellen. Die Faserbündel entwickelten vor und nach der Resensibilisierung die gleiche Kraft. Das war sowohl nach der Inkubation mit dem EDTA-Extrakt aus den Myofibrillen mit allen extrahierten Komponenten, als auch nach der Inkubation mit den leichten Ketten der Fall. Wahrscheinlich wurden nur noch die kontraktionswirksamen Interaktionsstellen resensibilisiert und wieder der $Ca^{2+}$-Kontrolle unterworfen.

Bemerkenswert ist, daß mit den regulatorischen leichten Ketten des Myosins wieder eine fast vollständige $Ca^{2+}$-Abhängigkeit der Interaktion zu erzielen und die Kooperativität in der Kraftentwicklung wieder herzustellen war. Trug man die relative Kraftentwicklung der desensibilisierten Faserbündel gegen die freie $Ca^{2+}$-Konzentration auf, so zeigte sich nämlich, daß die positive Kooperativität verloren gegangen war (s. S. 80, Abb. 40).

Die Experimente liefern somit Indizien, daß die leichten Ketten des Myosins Sensibilisatoren des durch $Ca^{2+}$ allosterisch aktivierten Aktomyosinsystems bei S. nudus sind. Sie zeigen auch, daß die regulatorischen Proteine am Myosin den Modus der Interaktion zwischen Aktin und Myosin in Abhängigkeit von der $Ca^{2+}$-Konzentration bestimmen können, vergleichbar dem TN-TM-System der Vertebratenskelettmuskel.

Weniger erfolgreich waren die Resensibilisierungsversuche mit den EDTA-Extrakten aus den eingespannten Faserbündeln, denen, um die Bindungskapazität des EDTA für $Mg^{2+}$ zu kompensieren oder zu übertreffen, 10 bzw. 20 $mmol \cdot l^{-1}$ $Mg^{2+}$ zugesetzt wurde. Eine Rückbindung regulatorischer Proteine könnte durch eine reversible Konformationsänderung der Proteine in EDTA- und MgEDTA-Gegenwart verhindert sein.

Da sich beim desensibilisierten Aktomyosin gezeigt hatte, daß das Aktomyosinsystem thermostabil gegenüber einer Temperatur von $30^{o}$ C ist, wurde angenommen, daß in den Faserpräparaten

die EDTA- und Temperatur-Behandlung die Ordnung des kontraktilen Apparates oder Mechanismen der Aktin-Myosin-Interaktion irreversibel verändert haben, und so Ursache für den partiellen Verlust der Kontraktilität und das Ausbleiben der Wiederherstellung der Kraftentwicklung trotz Resensibilisierung sind.

Die Abnahme der Kraftentwicklung steht also vermutlich nicht allein, wie beim Molluskenmuskelpräparat (Ojima et al., 1984), im Zusammenhang mit der Desensibilisierung des Myosins, wo eine Wiederherstellung der ursprünglichen Kraftentwicklung nach der Rekombination mit den EDTA-extrahierten leichten Ketten erhalten wurde.

### 6. Die Rolle des Nukleotids

Wurde ATP durch ITP (5 $mmol \cdot l^{-1}$) ersetzt, erhielt man in der pCa-Spannungskurve der Längsfaserbündel eine Veränderung der Kooperativität (s. S. 54, Abb.24). Die Faserbündel kontrahierten mit ITP scheinbar $Ca^{2+}$-unabhängig. Ihre Kraft ließ sich nur gering durch $Ca^{2+}$ steigern. Die pCa-Spannungskurve mit ITP ist flach. Der Hill-Koeffizient für die Beziehung ist 1. Die Wechselwirkung der $Ca^{2+}$-bindenden Stellen scheint aufgehoben zu sein, denn es war wohl vorauszusetzen, daß die Bindungsstellen für $Ca^{2+}$ noch präsent waren. Nur in Anwesenheit des Myokinasehemmers erscheint das Faserbündel derart "desensibilisiert", was möglicherweise auf eine interne Aktivität einer Myokinase schließen läßt, wenn der Hemmer nicht zugegeben wurde. Das gebildete ATP scheint für die Erschlaffung der Faserbündel ausreichend. Auf die $Ca^{2+}$-abhängige Kraftentwicklung mit ATP hat der Myokinasehemmer einen aktivierenden Einfluß. Der Hill-Koeffizient der Beziehung war fast verdoppelt.

Für die Faserbündel des Vertebratenskelettmuskels zeigte Fuchs (1985) in Anwesenheit des Nukleotids und auch des Hemmers einen entsprechenden Zusammenhang zwischen $Ca^{2+}$-Konzentration und Kraftentwicklung. Sie konnte zeigen, daß

trotz der drastischen Veränderung in der pCa-Spannungs-Beziehung durch das Nukleotid, die $Ca^{2+}$-Bindung an die Faserbündel unverändert blieb. Sie schloß daraus, daß die Kraftentwicklung per se nicht bestimmend ist für die Affinität der $Ca^{2+}$-bindenden Proteine und, daß im physiologischen $Ca^{2+}$-Konzentrationsbereich das gebundene $Ca^{2+}$ eine Funktion der freien $Ca^{2+}$-Konzentration ist und nicht der Kraft, die entwickelt wird.

Die $Ca^{2+}$-Kontrolle der Kraftentwicklung ist bei micromolaren $Mg^{2+}$-ATP-Konzentrationen anscheinend in gleicher Form ausgeschaltet. An gehäuteten Faserbündeln vom Vertebratenskelettmuskel (Godt, 1974) und vom Flußkrebsmuskel (Reuben et al., 1971) konnte gezeigt werden, daß in Rigor-Lösung die Kraftentwicklung nicht mehr der $Ca^{2+}$-Kontrolle unterlag.

Die Arbeiten von Reuben et al. (1971) und Brandt et al. (1972) an gehäuteten Fasern vom Flußkrebs zeigen, daß die Kooperativität in der pCa-Spannungskurve mit der Substratkonzentration zusammenhängt. Bei ihren Experimenten zur Rolle der Triphosphate in Kontraktion und Erschlaffung erhielten sie bei der Auftragung der Kraftentwicklung gegen die Substratkonzentration ($Mg^{2+}$-ATP) bei verschiedenem pCa glockenförmige Aktivierungskurven. Mit Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration blieb der Anstieg der Optimumskurven im gleichen Konzentrationsbereich, aber die Optima, bei höher werdender Kraftamplitude, verschoben sich zu höheren Substratkonzentrationen. Das heißt, bei niedrigerem pCa waren immer höhere $Mg^{2+}$-ATP-Konzentrationen notwendig, um die Faserbündel zu erschlaffen. Eine Gleichung für Substratinhibition erklärte den experimentell gefundenen Zusammenhang von Kraftentwicklung und Substrat und ließ die Autoren folgern, daß Substratinhibition an der Erschlaffung der kontraktilen Proteine beteiligt sei (Brandt et al., 1972). Aus der Kurvenschar schlossen sie, daß nur Faserbündel, die in supraoptimaler $Mg^{2+}$-ATP-Konzentration erschlafft sind, durch die Verringerung des pCa aktiviert werden können.

Für die Faserbündel von Sipunculus, waren die $Mg^{2+}$-ATP-Kon-

zentrationen (0,1 - 5 mmol·$l^{-1}$) wahrscheinlich supraoptimal (s. S. 52, Abb. 23). In $Ca^{2+}$-Abwesenheit herrscht Substratinhibition vor, die durch eine sehr geringe Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration aufzuheben war (s. Abb. 5 und 24 auf S. 29 bzw. S. 54).

War $Mg^{2+}$-ITP Substrat, verschob sich die Kurvenschar von Kraftentwicklung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bei verschiedenem pCa um drei pMgITP-Einheiten zu geringerem pMgITP (Reuben et al., 1971). Danach wäre eine etwa tausendfach höhere $Mg^{2+}$-ITP-Konzentration als $Mg^{2+}$-ATP-Konzentration notwendig, um $Ca^{2+}$-abhängige Kontraktion und Erschlaffung zu erhalten. Das wären Substratkonzentrationen im molaren Bereich.

In den Experimenten wurden millimolare Konzentrationen an ITP angeboten. Die erst $Ca^{2+}$-unabhängige Kraftentwicklung und die geringe Erhöhung der Kraftentwicklung durch steigende $Ca^{2+}$-Konzentrationen wäre zu erklären, wenn für das Aktomyosinsystem geltend gemacht werden kann, daß dafür die $Mg^{2+}$-ITP in suboptimaler Konzentration vorlag.

Die von Brandt et al. (1972) kalkulierten pCa-Spannungskurven bei verschiedenen Substratkonzentrationen, kalkuliert unter der Annahme, daß Kontraktion und Erschlaffung durch das Substrat induziert werden und daß der Erschlaffungseffekt von zuviel Substrat verdrängt wird durch $Ca^{2+}$, zeigen, daß mit zunehmender Substratkonzentration die Kooperativität in der Kraftentwicklung zunimmt. Die für micromolare, also für das System suboptimale Konzentration an $Mg^{2+}$-ATP kalkulierte Kurve, zeigt eine reduzierte absolute Kraftentwicklung, die bei Erniedrigung des pCa kaum ansteigt. Die Kraftentwicklung der Faserbündel von S. nudus mit $Mg^{2+}$-ITP in Abhängigkeit von der $Ca^{2+}$-Konzentration ist der flachen pCa-Spannungskurve sehr ähnlich.

Der gefundene Unterschied in den pCa-Spannungskurven, in der absoluten Kraftentwicklung und in der Erschlaffungsfähigkeit der Faserbündel mit ITP gegenüber ATP, resultiert also

wahrscheinlich aus den unterschiedlichen Optimumskonzentrationen für ITP und ATP. Die geringere Affinität von ITP für die Nukleotidbindungsstelle ist unter anderem durch den Unterschied in der Position 6 des Purinringes bedingt (Grishin et al., 1984). Der $K_M$-Wert des HMM vom Vertebratenskelettmuskel z.B. ist für ITP 30-50fach höher als der für ATP (Grishin et al., 1984).

Die $Ca^{2+}$-abhängige aktinaktivierte Myosin-ITPase-Aktivität ist übereinstimmend damit geringer als die Aktivität mit ATP. Die Umsatzrate mit ITP betrug 65% derjenigen mit ATP. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität blieb hoch. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die enzymatische Aktivität des natürlichen Aktomyosins mit ITP etwa nur 13% der Aktivität mit ATP in $Ca^{2+}$-Anwesenheit ausmachte. Sie war damit bedeutend geringer (ca. 25%) als die Aktivität des Hybrids aus dem Myosin von S. nudus und dem unregulierten Aktin. ITP ist also offenbar ein schlechteres Substrat für die Aktomyosin-ATPase mit komplettem Satz regulatorischer Proteine. Die Kontrollproteine der dünnen Filamente scheinen hemmend auf die enzymatische Aktivität des Aktomyosins mit ITP zu wirken.

Die geringere Aktivität ist Ausdruck einer längeren Lebensdauer intermediärer Zustände des Querbrückenzyklus und ist wahrscheinlich Korrelat der beobachteten $Ca^{2+}$-unabhängigen Kraftentwicklung mit ITP, die in ihrer $Ca^{2+}$-Abhängigkeit zuvor mit den Rigor-Kontraktionen bei geringer ATP-Konzentration parallelisiert wurde. Starke Rigor-Kontraktionen wurden an Präparaten von maßgeblich TN-TM-regulierten Muskeln gefunden (Godt, 1974; Best et al., 1977). Sie beruhen auf der Verdrängung des TN-TM-Komplexes von der Hemmposition durch die Rigor-Querbrücken, wodurch in kooperativer Weise weitere Interaktionsstellen freigelegt werden (Bremel & Weber, 1972), und dadurch eine $Ca^{2+}$-unabhängige Kraftentwicklung ermöglicht wird. In dual regulierten Muskeln kann die Rigor-Kontraktion vermutlich als ein Indikator für die Wirksamkeit eines TN-TM-Systems gedeutet werden, da bei myosinregulierten Systemen (Gordon, 1978; Godt & Morgan, 1984; Knox et al, 1986) keine Rigor-Kontraktionen bzw. kaum eine Rigor-Komplexbildung er-

halten wird.

Da die pCa-Spannungskurven von desensibilisierten Fasern und mit $Mg^{2+}$-ITP-inkubierten Fasern eine ähnliche Form haben könnte das demonstrieren, daß durch die Entfernung der leichten Ketten die Substratinhibition durch ATP reduziert wurde und andeuten, daß die EDTA-leichten Ketten die Nukleotidbindungsstelle beeinflussen können. Für eine Veränderung des Gleichgewichts verschiedener intermediärer Zustände des Querbrückenzyklus spricht, daß in den desensibilisierten Faserbündeln mit ITP keine Kraft mehr auszulösen war, während die resensibilisierten Faserbündel wieder mit ITP kontrahierten (s. S. 75, Abb. 37).

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Hauptanliegen der Arbeit war es die Proteine des kontraktilen Apparates der dual regulierten schräggestreiften Muskulatur zu isolieren und die myosingekoppelte Regulation zu untersuchen. Die Effizienz regulierender Parameter wurde über die Änderungen der relativen isometrischen Kraftentwicklung isolierter, chemisch gehäuteter (Triton-X-100; 1%) Faserbündel bzw. der ATPase-Aktivität des isolierten Aktomyosins oder Myosins gemessen.

An den gehäuteten Faserbündeln aus der Längsmuskulatur (LM) und aus dem Retraktor ließ sich mit $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ und ATP Kraftentwicklung auslösen. Die Faserbündel (Durchmesser: 200 - 500 um) kontrahierten innerhalb von 1,5 bis 2,5 min maximal und entwickelten eine Kraft von etwa 1,6 kg/cm$^2$.

Die relative isometrische Kraftentwicklung erwies sich als stark empfindlich gegenüber der steigenden freien $Ca^{2+}$-Konzentration. Die pCa-Spannungskurven stiegen innerhalb einer pCa-Einheit im micromolaren $Ca^{2+}$-Konzentrationsbereich sigmoid an. Eine Steigerung der $Ca^{2+}$-Konzentration um das 3-5fache bei den Faserbündeln aus der Längsmuskulatur bzw. um das 2-3fache bei den Faserbündeln aus den Retraktoren war ausreichend, um die relative Kraftentwicklung von 10% auf 90% zu erhöhen. Die Hill-Koeffizienten von 3,2 (LM) und 4,5 (Retraktor) deuteten eine Beteiligung von mindestens 3-4 hinsichtlich der Kraftentwicklung positiv kooperativ interagierenden $Ca^{2+}$-Bindungsstellen an.
Die Kooperativität der Interaktion erwies sich als abhängig vom Substrat. Bei der Substitution von ATP duch ITP (5 mmol·l$^{-1}$) war die positive Kooperativität eindeutig aufgehoben ($n_H = 1$).

An unterschiedlich lang tritonextrahierten Faserbündeln ließen sich zweierlei Wirkungen von Koffein demonstrieren. Auf in submaximaler $Ca^{2+}$-Konzentration inkubierte Faserbündel wirkte Koffein aktivierend. Diese Veränderung der $Ca^{2+}$-Sensitivität war unabhängig von der Häutungsdauer. Die koffeinsensitiven Stellen sind vermutlich an den Myofilamenten lokalisiert.
Von der Häutungsdauer abhängig war die Amplitude der nach einem Kontraktions-Erschlaffungs-Zyklus in Erschlaffungspuffer mit Koffein induzierbaren Kraft. Mit zunehmender Häutungsdauer nahm die koffeininduzierte Kraftentwicklung ab und war bei 1,5 h lang behandelten Faserbündeln nicht mehr auszulösen. Die von Koffein beeinflußten, vermutlich $Ca^{2+}$-freisetzenden, Kompartimente waren innerhalb dieser Zeit durch das Detergens desensibilisiert und wahrscheinlich zerstört.

Die Beteiligung einer $Ca^{2+}$-CaM-abhängigen Myosinkinase an der Kontraktionsregulation der Muskulatur von Sipunculus nudus konnte aufgrund einer Serie indirekter Experimente ausgeschlossen werden.
Unter der Annahme, daß eine aktive oder aktivierbare Myosinkinase noch in den kurzzeitig gehäuteten Faserpräparaten vorhanden war, wurde durch Zusatz von verschiedenen Agenzien (CaM; TFP; CPZ; ITP; ATP$\gamma$S; cAMP) eine mögliche Regulation

über eine Phosphorylierung der leichten Ketten durch eine Myosinkinase überprüft. Das Kontraktionsverhalten von gehäuteten Faserbündeln aus dem Myometrium des Rattenuterus diente als Vergleich.

1.) Calmodulin hatte in Konzentrationen (5 - 19 $umol \cdot l^{-1}$), die zu einer Aktivierung der Faserbündel aus der glatten Muskulatur führten, keinen aktivierenden Einfluß auf die in submaximaler $Ca^{2+}$-Konzentration kontrahierten Faserbündel von Sipunculus nudus.
2.) Die $Ca^{2+}$-induzierte Kraftentwicklung ließ sich nicht durch die calmodulinspezifischen Inhibitoren Trifluoperazin und Chlorpromazin in dem für calmodulinabhängige Reaktionen relevanten Inhibitor-Konzentrationsbereich hemmen.
3.) Bei der Substitution von ATP durch ITP kontrahierten die Faserbündel aus der schräggestreiften Muskulatur von Sipunculus nudus $Ca^{2+}$-abhängig. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität der Kraftentwicklung ist von der ITP-Konzentration (0,1 $mmol \cdot l^{-1}$ - 5 $mmol \cdot l^{-1}$; 0,2 $mmol \cdot l^{-1}$ $Ap_5A$) abhängig. ITP ist Substrat der Aktomyosin-ATPase. Die Faserpräparate vom Rattenuterus kontrahierten mit ITP nicht $Ca^{2+}$-abhängig.
4.) Die Vorbehandlung der Faserbündel vom Rattenuterus mit ATPγS in Kontraktionspuffer führte zu einer $Ca^{2+}$-unabhängigen Kraftentwicklung wenn die Faserbündel im Anschluß daran in ATP-haltiger Lösung inkubiert wurden. Die phosphataseresistente Thiophosphorylierung der leichten Ketten durch die Myosinkinase war vermutlich Ursache für die irreversible maximale Aktivierung der Faserpräparate.
Die Faserbündel von Sipunculus nudus kontrahierten nach Inkubation mit ATPγS mit ATP ebenfalls $Ca^{2+}$-unabhängig. Diese Kraftentwicklung war jedoch submaximal und transitorisch. Die Faserbündel behielten ihre $Ca^{2+}$-Sensitivität. Der Einfluß einer $Ca^{2+}$-CaM-abhängigen Myosinkinase wurde jedoch ausgeschlossen, da auch die Präinkubation mit ATPγS in $Ca^{2+}$-freier Lösung diese submaximale transitorische Kraftentwicklung mit ATP nach sich zog. In einer Konzentration von 2 $mmol \cdot l^{-1}$ scheint ATPγS auf die Querbrückenkinese nur eines Teils der Querbrücken einzuwirken, was aber nur bei direkt anschließender Inkubation mit ATP zum Ausdruck kam.

Einige Charakteristika, die für eine Lokalisierung der $Ca^{2+}$-Kontrolle am Myosin entscheidend sind und für eine Regulation der Aktomyosinwechselwirkung über eine direkte Bindung von $Ca^{2+}$ an das Myosin sprechen, konnten herausgearbeitet werden.

1.) Die aktinaktivierte ATPase-Aktivität des isolierten Myosins von Sipunculus nudus hybridisiert mit unreguliertem Aktin vom Kaninchen-Skelettmuskel war im Bereich physiologischer $Ca^{2+}$-Konzentrationen für $Ca^{2+}$ empfindlich.
2.) In Anwesenheit von $Mg^{2+}$ in millimolaren Konzentrationen (4 $mmol \cdot l^{-1}$) wurde Calcium von dem isolierten Myosin im Bereich micromolarer $Ca^{2+}$-Konzentrationen gebunden. Diese $Ca^{2+}$-spezifischen, relativ hochaffinen $Ca^{2+}$-Bindungsstellen sind wahrscheinlich die Vermittler der Empfindlichkeit für $Ca^{2+}$. Die Affinität der "nicht-spezifischen" $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-Bindungsstellen des Myosins vom Vertebratenskelettmuskel war unter gleichen Bedingungen deutlich geringer.

3.) Im kompetetiven Aktin-Aktivierungstest blieb die $Ca^{2+}$-Sensitivität der ATPase-Aktivität des Aktomyosins unverändert.
4.) Wurde Myosin, Aktomyosin oder die gehäuteten Faserbündel von Sipunculus nudus mit EDTA (10 $mmol \cdot l^{-1}$) behandelt, so wurde eine Abnahme der $Ca^{2+}$-Sensitivität der ATPase-Aktivität bzw. der Kraftentwicklung erzielt. Die $Ca^{2+}$-Kontrolle ließ sich beim Aktomyosin und bei den gehäuteten Fasern durch Rekombination mit der DTNB-extrahierten leichten Ketten des Myosins von Sipunculus nudus wieder herstellen. Die $Ca^{2+}$-Sensitivität des Aktomyosins wurde durch die Desensibilisierung von 94% auf 30% verringert und wurde bei einem Gewichtsverhältnis von Aktomyosin zu LC von 1 : 43 maximal auf 54% erhöht. Bei den desensibilisierten (30 min; 35° C) Faserpräparaten war die $Ca^{2+}$-Sensitivität auf 41% reduziert. Die Kraftentwicklung nahm auf 30% ab. Die Rekombination mit den leichten Ketten ließ sich durch die Wiederherstellung der $Ca^{2+}$-Sensitivität von 100% in den Faserpräparaten nachweisen. Die Kraftentwicklung blieb unverändert. Die DTNB-extrahierte leichte Ketten mit $M_r$ von etwa 17 000 ist demnach eine regulatorische leichte Kette, die sich reversibel vom Myosin entfernen läßt. Das isolierte Peptid ließ sich durch Hitzebehandlung nicht irreversibel denaturieren.

## VI. ABKÜRZUNGEN

| | |
|---|---|
| AMP-PCP | Adenylyl ( $\beta,\gamma$ methylen)-diphosphonat |
| AMS | Ammoniumsulfat |
| $Ap_5A$ | $P^1,P^5$-Di(adenosin-5′-)pentaphoshat |
| ATP | Adenosin-5′-triphosphat |
| ATP$\gamma$S | Adenosin-5′-O-(3-thiotriphosphat) |
| CaM | Calmodulin |
| $Ca^{2+}$-CaM | Calcium-Calmodulinkomplex |
| cAMP | Adenosin-3′:5′-monophosphorsäure, cyclisch |
| CPZ | Chlorpromazin |
| DTNB | 5,5′-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure) |
| DTT | Dithiothreit |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykol-bis (2-aminoethylether)-N,N′tetra-essigsäure |
| HMM | Heavy Meromyosin - schweres Meromyosin, tryptisches Spaltprodukt des Myosinmoleküls |
| HMS | Hautmuskelschlauch |
| ITP | Inosin-5′-triphosphat |
| LC | Light Chain; leichte Kette des Myosinmoleküls |
| LM | Längsmuskulatur |
| $M_r$ | relative Molekülmasse |
| MLCK | Myosinkinase |
| $P_i$ | anorganisches Phosphat |
| PAGGE | Polyacrylamid-Gradienten-Gelelektrophorese |
| pCa; pTFP | Negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration der angegebenen Substanz |
| PK | Proteinkinase |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| RM | Ringmuskulatur |
| RT | relative Kraftentwicklung |
| S1 | Subfragment-1, proteolytisches Spaltprodukt des Myosinmoleküls |
| S2 | Subfragment-2, proteolytisches Spaltprodukt des Myosinmoleküls |
| SDS | Dodecylsulfat.Na-salz |
| SR | Sarkoplasmatisches Retikulum |
| TFP | Trifluoperazin-dihydrochlorid |
| TM | Tropomyosin |
| TN | Troponin |
| TnC | Troponin-C |
| TN-TM | Troponin-Tropomyosin-Komplex |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |

## VII. LITERATURVERZEICHNIS


Achazi, R.K. (1979). Phosphorylation of molluscan paramyosin. Pflügers Arch. **379**, 197-201.

Adelstein, R.S.; Klee, S.B. (1981). Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. J. Biol. Chem. **256**, 7501-7509.

Adelstein, R.S.; Pato, M.D.; Conti, M.A. (1980). Regulation of smooth muscle myosin kinase activity by phosphorylation and dephosphorylation. Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms (Ebashi S. et al., eds.). 303-313.

Ashiba, G.; Asada, T.; Watanabe, S. (1980). Calcium regulation in clam foot muscle. J. Biochem. **88**, 837-846.

Bagshaw, C.R.; Kendrick-Jones, J. (1979). Characterization of homologous divalent metal ion binding sites of vertebrate and molluscan myosins using electron paramagnetic resonance spectroscopy. J. Mol. Biol. **130**, 317-336.

Baltzer, F. (1931) Sipunculida. In: Kükenthal, W.; Krumbach, T. (Hrsg.): Handbuch der Zoologie Bd. II. ; de Gruyter, Berlin.

Beinfeld, M.C.; Bryce, D.A.; Kochavy, D.; Martonosi, A. (1975). The binding of divalent cations to myosin. J. Biol. Chem. **250**, 6282-6287.

Bennet, A.J.; Bagshaw, C.R. (1986). The mechanism of regulatory light chain dissociation from scallop myosin. Biochem. J. **233**, 179-186.

Best, P.M.; Donaldson, S.K.B.; Kerrick, W.G.L. (1977). Tension in mechanically disrupted mammalian cardiac cells: Effects of magnesium adenosine triphosphate. J. Physiol. **265**, 1-17.

Bianchi, C.P. (1962). Kinetics of radiocaffeine uptake and release in frog sartorius. J. Pharm. exp. Ther. **138**, 41-47.

Blumenthal, D.K.; Stull, J.T. (1980). Activation of skeletal muscle myosin light chain kinase by calcium (2+) and calmodulin. Biochemistry **19**, 5608-5614.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254.

Brandt, P. W.; Reuben, J. P.; Grundfest, H. (1972). Regulation of tension in the skinned crayfish muscle fiber. II. Role of calcium. J. Gen. Physiol. **59**, 305-317.

Bremel, R. D.; Weber, A. (1972). Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. Nature New Biol. **238**, 97-101.

Cassidy, P.; Hoar, P.E.; Kerrick, W.G.L. (1979). Irreversible thiophosphorylation and activation of tension in functionally skinned rabbit ileum strips by $^{35}$S!ATP$\gamma$S. J. Biol. Chem. **254**, 11148-11153.

Cassidy, P.; Hoar, P.E.; Kerrick, W.G.L. (1980). Inhibition of $Ca^{2+}$-activated tension and myosin light chain phosphorylation in skinned smooth muscle strips by the phenothiazines. Pflügers Arch. **387**, 115-120.

Cassidy, P.S.; Kerrick, W.G.L.; Hoar, P.E.; Malencik, D.A. (1981). Exogenous calmodulin increases $Ca^{2+}$ sensitivity of isometric tension activation and myosin phosphorylation in skinned smooth muscle. Pflügers Arch. **392**, 115-120.

Cassidy, P.; Kerrick, W.G.L. (1982). Superprecipitation of gizzard actomyosin, and tension in gizzard muscle skinned fibers in the presence of nucleotides other than ATP. Biochim. Biophys. Acta **705**, 63-69.

Chacko, S.; Conti, M.A.; Adelstein, R.S. (1977). Effect of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation and $Ca^{2+}$ regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 129-133.

Chacko, S.; Rosenfeld, A. (1982). Regulation of actin-activated ATP hydrolysis by arterial myosin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 292-296.

Chantler, P.D.; Szent-Györgyi, A.G. (1980). Regulatory light-chains and scallop myosin: Full dissociation, reversibility and co-operative effects. J. Mol. Biol. **138**, 473-492.

Cheung, W.G. (1970) Biochem. Biophys. Res. Comm. **38**, 533-538.

Conti, M.A.; Adelstein, R.S. (1981). The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3′: 5′ cAMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chemistry **256**, 3178-3181.

Cornish-Bowden, A.; Koshland Jr, D.E. (1975). Diagnostic uses of the Hill (Logit and Nernst) plots. J. Mol. Biol. **95**, 201-212.

Dabrowska, R.; Sherry, J.M.F.; Aromatorio, D.K.; Hartshorne, D.J. (1978). Modulator protein as a component of the myosin light kinase from chicken gizzard. Am. Chem. Soc. **17**, 253-258.

DeEguileor, M.; Valvassori, R. (1977). Studies on the helical and paramyosinic muscles. VII. Fine structure of body wall muscles in Sipunculus nudus. J. Submicr. Cytol. **9 (4)**, 363-372.

D'Haese, J. (1980). Regulatory light chains of myosin from the obliquely-striated body wall muscle of Lumbricus terrestris. FEBS Letters **121**, 243-245.

Ebashi, S.; Endo, M. (1968). Calcium ions and muscle contraction. Progr. biophys. and molec. Biol. **18**, 123-183.

Ebashi, S.; Mikawa, T.; Hirata, M.; Toyo-oka, T.; Nonomura, Y. (1977). Regulatory proteins of smooth muscle. Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle (R. Casteels et al. eds.) Elsevier/North Holland, Biomedical Press. 325-335.

Elliot, A.; Offer, G. (1978). Shape and flexibility of the myosin molecule. J. Mol. Biol. **123**, 505-519.

Endo, M.; Kitazawa, T.; Yagi, S.; Iino, M.; Kakuta, Y. (1977). Some properties of chemically skinned smooth muscle fibers. Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle (R. Casteels et al., eds.) Elsevier/North Holland, Biomedical Press, 199-209.

Endo, M.; Kitazawa, T.; Yagi, S. (1980). Different features of responses of the sarcoplasmic reticulum in cardiac and smooth muscles. Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms (Ebashi S. et al., eds.) Japan Sci. Soc. Press Tokyo / Springer-Verlag, Berlin. 447-463.

Fabiato, A.; Fabiato, F. (1976). Techniques of skinned cardiac cells and of isolated cardiac fibres with disrupted sarcolemmas, with reference to the effects of catecholamines and of caffeine. In: Roy, P.E.; Dhalla, N.S. (eds.). Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism, 9 The sarcolemma. University Park Press, Baltimore, 71-94.

Fiske, C.H.; Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-400.

Flicker, P.F.; Wallimann, T.; Vibert, P. (1983). Electron microscopy of scallop myosin. Location of regulatory light chains. J. Mol. Biol. 169, 723-741.

Fuchs, F. (1985). The binding of calcium to detergent-extracted rabbit psoas muscle fibres during relaxation and force generation. J. Musc. Res. Cell Motility. 6, 477-486.

Fuchs, F. ; Black, B. (1980) The effect of magnesium on the binding of calciumions to glycerinated rabbit psoas muscle fibres Biochim. Biophys. Acta 622, 52-62.

Fuchs, F.; Fox, C. (1982), Parallel measurements of bound calcium and force in glycerinated rabbit psoas muscle fibers. Biochim. Biophys. Acta 679, 110-115.

Fürst, D.O.; Cross, R.A.; DeMey, J.; Small, J.V. (1986) Caldesmon is an elongated, flexible molecule localized in the actomyosin domains of smooth muscle. EMBO J. 5, 251- 257.

Gagelmann, M; Mrwa, U.; Bostrom, S.; Rüegg, J.C. Hartshorne, D. (1984). Effect of $Ca^{2+}$-independent myosin light chain kinase on different skinned smooth muscle fibers. Pflügers Arch. **401**, 107-109.

Godt, R.E. (1974). Calcium-activated tension of skinned muscle fibers of the frog. Dependence on magnesium adenosin triphosphate concentration J. Gen. Physiol. **63**, 722-739.

Godt, R,E; Morgan, J.L. (1984). Contractile responses to MgATP and pH in a thick filament regulated muscles: Studies with skinned scallop fibers. In: Contractile mechanisms in muscle ( Pollack, G.H.; Sugi, H.; eds) Plenum Press, New York 569-572.

Goldberg, A;. Lehman, W. (1978). Troponin-like proteins from muscles of the scallop Aequipecten irradians. Biochem. J. **171**, 413-418.

Gordon, A.R. (1978). Contraction of detergent-treated smooth muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 3527-3530.

Gorecka, A.; Aksoy, M.O.; Hartshorne, D.J. (1976). The effect of phosphorylation of gizzard myosin on actin activation. Biochem. Biophys. Res. Comm. **71**, 325-331.

Grishin, M.N.; Baranova, L.A.; Gulyaev, N.N.; Petushkova, E.V. (1984). Some peculiarities of the binding of the purine base of the substrate in the active site of myosin $Ca^{2+}$-ATPase (English translation). Biokhimiya **49**, 1785-1791.

Hardwicke, P.M.D.; Wallimann, T; Szent-Györgyi, A.G. (1983) Light chain movement and regulation in scallop myosin. Nature (Lond.) **301**, 478-482.

Hess, P.; Wier, W.G. (1984). Excitation-contraction coupling in cardiac Purkinje Fibres. Effects of caffeine on the intra-cellular $Ca^{2+}$ transient, membrane currents and contraction. J. Gen. Physiol. **83**, 417-433.

Hidaka, H.; Yamaki, T.; Naka, M.; Tanaka, T.; Hayashi, H.; Kobayashi, R. (1980). Calcium-regulated modulator protein interaction agents inhibit smooth muscle calcium-stimulated proteinkinase and ATPase. Mol. Pharmacol. **17**, 66-72.

Hirata, M.; Mikawa, T.; Nonomura, Y.; Ebashi, S. (1980). $Ca^{2+}$ regulation in vascular smooth muscle. II. $Ca^{2+}$ binding of aorta leiotonin. J. Biochem. **87**, 369-378.

Hoar, P.E.; Kerrick, W.G.L.; Cassidy, P.S. (1979). Chicken gizzard: Relation between calcium-activated phosphorylation and contraction. Science **204**, 503-506.

Huddart, H.; Alohan, F.J. (1981). Calcium binding by sarcoplasmic reticulum and mitochondria isolated from annelid visceral muscle in relation to whole muscle calcium influx and efflux. Comp. Biochem. Physiol. **68A**, 625-634.

Huxley, H.E. ; Hanson, J. (1954). Changes in the cross-striation of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. Nature **173**, 973-976.

Huxley, A.F.; Niedergerke, R. (1954). Structural changes in muscle during contraction. Nature **173**, 971-973.

Ikebe, M.; Barsotti, R,J.; Hinkins, S.; Hartshorne; D.J. (1984). Effects of magnesiumchloride on smooth muscle actomyosin adenosin-5´-triphopshatase activity, myosin conformation, and tension development in glycerinated fibers. Biochemistry, **23**, 5062-5068.

Itoh, T.; Kuriyama, H.; Suzuki, H. (1981). Excitation-contraction coupling in smooth muscle cells of guinea-pig mesenteric artery. J. Physiol. **321**, 513-535.

Itoh, T.; Izumi, H.; Kuriyama, H. (1982). Mechanisms of relaxation induced by activation of ß-adrenoceptors on smooth muscle cells of guinea-pig mesenteric artery. J. Physiol. **326**, 475-493.

Janis, R.A.; Barany, K.; Barany, M.; Sarmiento, J.G. (1981). Association between myosin light chain phosphorylation and contraction of rat uterine smooth muscle. Mol. Physiol. **1**, 3-11.

Jewell, B.R.; Rüegg, J.C. (1966). Oscillatory contraction of insect fibrillar muscle after glycerol extraction. Proc. Roy. Soc. Lond. (Biol.)**164**, 428-459.

Josephs, R; Harrington, W.F. (1968). On the stability of myosin filaments Biochemistry 7, 2834-2847.

Kendrick-Jones, J.; Lehman, W.; Szent-Györgyi, A.G. (1970). Regulation in molluscan muscles. J. Mol. Biol. **54**, 313-326.

Kendrick-Jones, J.; Szentkiralyi, E.M.; Szent-Györgyi, A.G. (1976). Regulatory light chains in myosins. J. Mol. Biol. **104**, 747-775.

Kerrick, W.G.L.; Bolles, L.L. (1981). Regulation of $Ca^{2+}$-acitivated tension in Limulus striated muscle. Pflügers Arch. **392**, 121-124.

Kerrick, W.G.L.; Bolles, L.L. (1982). Evidence that myosin light chain phosphorylation regulates contraction in the body wall muscle of the sea cucumber. J. Cell. Physiol. **112**, 307-315.

Kerrick, W.G.L.; Hoar, P.E.; Cassidy, P.S. (1980). Calcium-activated tension: The role of myosin light chain phosphorylation. Fedn. Proc. **39**, 1558-1563.

Kerrick, W.G.L.; Hoar, P.E.; Cassidy, P.S.; Bolles, L.; Malencik, D.A. (1981). Functional classification using skinned fibres. J. Gen. Physiol. **77**, 177-190.

Knox, M.K.; Szent-Györgyi, A.G.; Trueblood, C.E.; Weber, A.; Zigmond, S. (1986) The effect of low ATP concentrations on relaxation in the myosin regulated myofibrils from scallop. J. Musc. Res. Cell Motility **7**, 110-114.

Konno, K.; Arai, K.-I.; Watanabe, S. (1980). Myosin-linked calcium regulation in squid muscle. Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms (Ebashi S. et al., eds.) Japan Sci. Soc. Press Tokyo / Springer-Verlag, Berlin. 391-399.

Kretzinger, R.H. (1976). Calcium-binding proteins. Ann. Rev. Biochem **45**, 239-266.

Kuwayama, H.; Yagi, K. (1979). $Ca^{2+}$ bindings of pig cardiac myosin, subfragment-1, and g2 light chain. J. Biochem **85**, 1245-1255.

Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.

Lebowitz, E.A.; Cooke, R. (1979). Phosphorylation of uterine smooth muscle myosin permits actin-activation. J. Biochem. **85**, 1489-1494.

Lehman, W.; Kendrick-Jones, J.; Szent-Györgyi, A.G. (1973) Co Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **37**, 319-330.

Lehman, W.; Szent-Györgyi, A.G. (1975). Regulation of muscular contraction. Distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom. J. Gen. Physiol. **66**. 1-30.

Lehman, W. (1976). Phylogenetic diversitiy of the proteins regulating muscular contraction. Int. Rev. Cytol. **44**, 55-92.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randell, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.

Lüttgau, H.C.; Oetliker, H. (1968). The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres. J. Physiol. **194**, 51-74.

Marston, S.B.; Trevett, R.M.; Walters, M. (1980). Calcium ion-regulated thin filaments from vascular smooth muscle. Biochem. J. **185**, 355-365.

Marston, S.B. (1986) $Ca^{2+}$ can control vascular smooth muscle thin filaments without caldesmon phopshorylation. Biochem. J. **237**, 605-607.

Meinrenken, W. (1969). Calciumionen-unabhängige Kontraktion und ATPase bei glycerinierten Muskelfasern nach alkalischer Extraktion von Troponin. Pflügers Arch. **311**, 243-255.

Meisheri, K.D.; Rüegg, J.C. (1983). Dependence of cyclic-AMP induced relaxation on $Ca^{2+}$ and calmodulin in skinned smooth muscle of guinea pig Taenia coli. Pflügers Arch. **399**, 315-320.

Mikawa, T.; Nonomura, Y.; Ebashi, S. (1977). Does phosphorylation of myosin light chain have direct relation to regulation in smooth muscle? J. Biochem. **82**, 1789-1791.

Morimoto, K.; Harrington, W.F. (1974). Evidence for structural changes in vertebrate thick filaments induced by calcium. J. Mol. Biol. **88**, 693-709.

Moss, R.L.; Giulian, G.G.; Greaser, M.L. (1982). Physiological effects accompanying the removal of myosin $LC_2$ from skinned skeletal muscle fibers. J. Biol. Chem. **257**, 8588-8591.

Mrwa, U.; Troschka, M.; Rüegg, J.C. (1979). Cyclic AMP-dependent inhibition of smooth muscle actomyosin FEBS **107**, 371-374.

Ngai, P.K.; Walsh, M.P. (1984). Inhibition of smooth muscle actin-activated myosin $Mg^{2+}$-ATPase activity by caldesmon. J. Biol. Chem. **259**, 13656-13659.

Ngai, P.K.; Walsh, M.P. (1985). Properties of caldesmon isolated from chicken gizzard. Biochem. J. **230**, 695-707.

O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**, 4007-4021.

Ogawa, Y. (1968). The apparent binding constant of glycol-etherdiaminetetratacetic acid for calcium at neutral pH. J. Biochem. **64**, 255-257.

Ojima, T.; Nishita, K.; Watanabe, S. (1983). Heat ($30^{o}C$)-desensitization of Akazara striated adductor myosin, and its resensitization. J. Biochem. **93**, 607-613.

Ojima, T.; Nishita, K.; Watanabe, S. (1984). Hybrid with rabbit skeletal DTNB-light chains of heavy meromyosin, myosin and glycerinated fibers from Akazara scallop adductor. J. Biochem. **96**, 1109-1115.

Pfitzer, G.; Rüegg, J.C. (1982). Molluscan catch muscle: regulation and mechanics in living and skinned anterior byssus retractor muscle of Mytilus edulis. J. Comp. Physiol. **147**, 137-142.

Pires, E.M.V.; Perry, S.V. (1977). Purification and properties of myosin light chain kinase from fast skeletal muscle. Biochem. J. **167** 137-146.

Reuben, J.P.; Brandt, P.W.; Berman, M.; Grundfest, M. (1971). Regulation of tension in the skinned crayfish muscle fiber. I. Contraction and relaxation in the absence of Ca (pCa > 9). J. Gen. Physiol. 57, 385-407.

Rosenbluth, J. (1967). Obliquely striated muscle III. Contraction mechanism of Ascaris body muscle. J. Cell. Biol. 34, 15-33.

Rüegg, J.C.; Sparrow, M.P.; Mrwa, U. (1981). Cyclic-AMP mediated relaxation of chemically skinned fibres of smooth muscle. Pflügers Arch. 390, 198-201.

Saida, K. (1982). Intracellular Ca release in skinned smooth muscle. J. Gen. Physiol. 80, 191-202.

Saida, K.; Van Breemen, C. (1984). Cyclic AMP modulation of adrenoreceptor-mediated arterial smooth muscle contraction. J. Gen. Physiol. 84, 307-318.

Schäper, M. (1982) Isolierung und Charakterisierung kontraktiler Elemente von Sipunculus nudus L., Diplomarbeit, Universität Münster.

Sellers, J.R. (1981). Phosphorylation-dependent regulation of Limulus myosin. J. Biol. Chem. 256, 9274-9278.

Sherry, J.M.F.; Górecka, A.; Aksoy, M.O.; Dabrowska, R.; Hartshorne, D.J. (1978). Roles of calcium and phosphorylation in the regulation of the activity of gizzard myosin. Biochemistry 17, 4411-4418.

Sheterline, P. (1981). Trifluoperazine can distinguish between myosin light chain kinase-linked and troponin C-linked control of actomyosin interaction by $Ca^{2+}$. Biochem. Biophys. Acta. 93, 194-200.

Silver, P.J.; DiSalvo, J. (1979). Adenosine 3':5'-monophosphate-mediated inhibition of myosin light chain phopsphorylation in bovine aortic actomyosin. J. Biol. Chem. 254, 9951-9954.

Silver, P.J.; Stull, J.T. (1983). Myosin light chain phophorylation in smooth muscle and nonmuscle cells as a probe of calmodulin function. Meth. Enzymology 102, 62-74.

Simmons, R.M.; Szent-Györgyi, A.G. (1978). Reversible loss of calcium control of tension in scallop striated muscle associated with the removal of regulatory light chains Nature (Lond.). **273**, 62-64.

Small, J.V.; Sobieszek, A. (1977). Ca-regulation of mammalian smooth muscle actomyosin via a kinase-phosphatase-dependent phosporylation and depnosphorylation of the 20 000 Mr light chain of myosin. Eur. J. Biochem. **76**, 521-530.

Sobieszek, A. (1977) In the Biochemistry of smooth muscle (Stephens, N.L. ed.) Univ. Park Press, pp. 413-443.

Sobue, K.; Muramoto, Y.; Fujirata, M.; Kakiuchi, S. (1981). Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interact with F-actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 5652-5655.

Sobue, K.; Morimoto, K.; Kanda, K.; Fukanaga, K.; Miyamoto, E.; Kakiuchi, S. (1982). Interaction of a 135 kDa calmodulin binding protein (myosin light chain kinase) and F-actin, another $Ca^{2+}$-calmodulin dependent flip-flop switch. Biochem. Inter. **5**, 503-510.

Sparrow, M.P.; Mrwa, U.; Hofmann, F.; Rüegg, J.C. (1981). Calmodulin is essential for smooth muscle contraction. FEBS **125**, 141-145.

Sparrow, M.P.; Pfitzer, G.; Gagelmann, M.; Rüegg, J.C. (1984). Effect of calmodulin, $Ca^{2+}$, and cAMP protein kinase on skinned tracheal smooth muscle. Am. J. Physiol. **246**, C308-C314.

Spudich, J.A.; Watt, S. (1971) The regulation of skeletal muscle contraction, I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. J. Biol. Chem. **246**, 4866-4871.

Stafford, W.F.; Szent-Györgyi, A.G. (1978). Physical characterization of myosin light chains. Biochemistry **17**, 607-614.

Stafford, W.F. III; Szentkiralyi, E.M.; Szent-Györgyi, A.G. (1979). Regulatory properties of single-headed fragments of scallop myosin. Biochemistry **18**, 5273-5280.

Stephenson, E. W. (1981) $Ca^{2+}$ dependence of stimulated $^{45}Ca$ efflux in skinned muscle fibers. J. Gen. Physiol 77, 419-443.

Stull, J.T.; Blumenthal, D.K.; Manning, D.R.; High, C.W. (1980). Regulation of myosin phosphorylation in different types of muscles. In: Calcium-binding proteins: Structure and function (Siegel, F.L.; Carafoli, E.; Kretzinger, R.H.; MacLennan, D.H.; Wassermann, R.H.; eds.) 263-270.

Su, J.Y.; Hasselbach, W. (1984). Caffeine-induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. Pflügers Arch. 400, 14-21.

Suzuki, H.; Konno, K.; Arai, K.; Watanabe, S. (1980). ATP-induced tension development in glycerinated fibers of scallop adductor striated muscle. J. Biochem. 88, 909-911.

Szent-Györgyi, A.G. (1951). Chemistry of muscular contraction 2nd edn., Academic Press, New York.

Szent-Györgyi, A.G.; Szentkiralyi, E.M.; Kendrick-Jones, J. (1973). The light chains of scallop myosin as regulatory subunits. J. Mol. Biol. 74, 179-203.

Toste, A.P.; Cooke, R. (1979). Interactions of contractile proteins with free and immobilized cibacron blue F3GA. Analyt. Biochem. 95, 317-328.

Twarog, B.M.; Muneoka, Y. (1973). Calcium and the control of contraction and relaxation in a molluscan catch muscle. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 489-503.

Vibert, P.J.; Craig, R. (1982). Three-dimensional reconstruction of thin filaments decorated with a $Ca^{2+}$-regulated myosin. J. Mol. Biol. 157, 299-319.

Vibert, P.; Szentkiralyi, E.; Hardwicke, P.; Szent-Györgyi, A.G. (1986) Structural models for the regulatory switch of myosin. Biophys. J. 49, 131-133.

Walsh, M.P.; Dabrowska, R.; Hinkins, S.; Hartshorne, D.J. (1982). Calcium-independent myosin light chain kinase of smooth muscle. Preparation by limited chymotryptic digestion of the calcium ion dependent enzyme, purification, and characterization. Biochemistry **21**, 1919-1925.

Walters, M.; Marston, S.B. (1981). Phosphorylation of calcium ionregulated thin filaments from vascular smooth muscle. Biochem. J. **197**, 127-139.

Watanabe, S. (1980). Myosin-linked regulation in chicken gizzard muscle and in clam foot muscle. Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms (Ebashi S. et al., eds.) Japan Sci. Soc. Press, Tokyo / Springer-Verlag Berlin. 315-328.

Weber, A.; Herz, R. (1968). The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. J. Gen. Physiol. **52**, 750-759.

Weber, A.; Murray, J.M. (1973). Molecular control mechanisms in muscle contraction. Physiol. Rev. **53**, 612-673.

Weeds, A.G.; Taylor, R.S. (1975) Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. Nature **257**, 54-56.

Wells, C.; Bagshaw, C.R. (1985). Calcium regulation of molluscan myosin ATPase in the absence of actin. Nature (Lond.) **313**, 696-697.

Wendt, I.R.; Stephenson, D.G. (1983). Effects of caffeine on Ca-activated force production in skinned cardiac and skeletal muscle fibres of the rat. Pflügers Arch. **398**, 210-216.

Wikman-Coffelt, J. (1980). Properties of the non-specific calcium-binding sites of rabbit skeletal-muscle myosin. Biochem. J. **185**, 265-268.

Winkelmann, D. A.; Lowey, S.; Press; J. L. (1983). Monoclonal antibodies localize changes in myosin heavy chain isoenzymes during avian myogenisis. Cell **34**, 295-306.

Winkelmann, D.A.; Almeda, S.; Vibert, P.; Cohen, C. (1984) A new myosin fragment: visualization of the regulatory domain. Nature (Lond.), **307**, 758-760.

Yazawa, M.; Sakuma, M.; Yagi, K. (1980). Calmodulins from muscles of marine invertebrates, scallop and sea anemone. Comparison with calmodulins from rabbit skeletal muscle and pig brain. J. Biochem. **87**, 1313-1320.

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. M. K. Grieshaber danke ich für die interessante Themenstellung, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. J. D'Haese danke ich für wertvolle Anregungen, stete Diskussionsbereitschaft und für die freundliche überlassung von HMM, Myosin und Aktin vom Vertenbratenskelettmuskel für die Vergleichsstudien.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. J.C. Rüegg (Universität Heidelberg) für sein Interesse an der Arbeit, für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten und für die freundliche Überlassung von Calmodulin.

Herrn Dr. H.K. Wasner und Frau U. Salge vom Diabetes-Forschungsinstitut an der Universität Düsseldorf danke ich für die Hilfe bei der Tiermaterialbeschaffung für die Vergleichsstudien.